
**CHARAKTERISIERUNG UND
FUNKTIONALISIERUNG VON FILMEN AUS
REKOMBINANTEN SPINNENSEIDENPROTEINEN**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
- Doktor der Naturwissenschaften -
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von
Diplom-Biologin
Kristina Spieß
Bayreuth 2012

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2005 bis Dezember 2007 am Lehrstuhl für Biotechnologie der TU München in der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Scheibel begonnen und von Januar 2008 bis April 2011 am Lehrstuhl für Biomaterialien der Universität Bayreuth unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheibel fortgeführt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. Nat.).

Dissertation eingereicht am: 10. April 2012

Zulassung durch die Prüfungskommission: 18. April 2012

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 15. Juni 2012

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Beate Lohnert

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Thomas Scheibel (Gutachter)

Prof. Dr. Franz X. Schmid (Gutachter)

Prof. Dr. Andreas Fery (Vorsitz)

Prof. Dr. Jürgen Senker

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Protein-basierte Materialien	1
1.1.1	Anwendungsbeispiele und Forschungsaktivitäten	2
1.1.2	Strukturelle Grundlagen mechanischer Eigenschaften	2
1.1.2.1	β -Schleifen: elastische Struktur gezeigt am Beispiel Elastin.....	4
1.1.2.2	<i>Coiled-coil</i> Struktur: Enthalpie-elastisches Verhalten gezeigt an Intermediärfilamenten..	5
1.1.2.3	β -Faltblatt-reiche Proteine	6
1.2	Spinnenseide	7
1.2.1	Aufbau und Struktur von <i>dragline</i> Seide	8
1.2.2	Hierarchischer Aufbau als Grundlage mechanischer Eigenschaften	10
1.2.3	Fadenassemblierung – der natürliche Spinnprozess	11
1.3	Rekombinante Spinnenseidenproteine.....	14
1.3.1	Assemblierung des rekombinanten Spinnenseidenproteins eADF4(C16) in verschiedene Morphologien.....	16
1.3.2	Seidenfilme	17
1.4	Zielsetzung	20
2	Material und Methoden.....	23
2.1	Material.....	23
2.1.1	Oligonukleotide, Peptide und Linker	23
2.1.1.1	Oligonukleotide	23
2.1.1.2	Peptide und Linker.....	23
2.1.2	Plasmide	23
2.1.3	Organismen	24
2.1.3.1	Bakterien.....	24
2.1.3.2	eukaryotische Zelllinie.....	24
2.1.4	Enzyme und Antikörper	24
2.1.5	Größenstandards und Kits	24
2.1.6	Chemikalien und Biochemikalien	25
2.1.7	Sonstige Materialien/Verbrauchsmaterialien	26
2.1.8	Geräte und technische Hilfsmittel.....	26
2.1.9	Computerprogramme	28
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	28
2.2.1	Anzucht von <i>Eschericia coli</i>	28

2.2.2	Präparation, Reinigung und Sequenzierung von Plasmid-DNA	28
2.2.3	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	29
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	29
2.2.5	Hybridisierung synthetischer Oligonukleotide	30
2.2.6	Amplifikation von DNA mittels PCR	30
2.2.7	Enzymatische Modifikation von DNA	31
2.2.7.1	Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen	31
2.2.7.2	Dephosphorylierung der 5`-Enden der Vektoren	31
2.2.7.3	Ligation	31
2.2.7.4	Klonierung rekombinanter Spinnenseidenproteine	32
2.2.8	Expression synthetischer Spinnenseidengene in <i>E. coli</i> und Reinigung rekombinanter Spinnenseidenproteine	33
2.2.8.1	Expressionskinetik und Löslichkeitsbestimmung	33
2.2.8.2	Fed batch-Fermentation	33
2.2.8.3	Reinigung rekombinanter Spinnenseidenproteine	34
2.3	Proteinanalytische Methoden	35
2.3.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	35
2.3.1.1	SDS-PAGE	35
2.3.1.2	Nativ-PAGE	35
2.3.1.3	Silberfärbung	36
2.3.1.4	Fluoreszenz-Imaging	36
2.3.2	Immunoblot (Western Blot)	36
2.3.3	Größenausschlusschromatographie (SEC)	37
2.3.4	Lichtstreuung	37
2.3.4.1	Statische Lichtstreuung	38
2.3.4.2	Dynamische Lichtstreuung	39
2.3.5	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	39
2.3.6	MALDI-TOF Massenspektrometrie	40
2.4	Proteinpräparative Methoden	40
2.4.1	Dialyse	40
2.4.2	Reduktion und Carboxymethylierung	40
2.4.3	Bestimmung freier Thiolgruppen mit Ellmans Reagens (DTNB)	41
2.4.4	Redoxtitration	41
2.4.5	Filmpräparation	42
2.4.6	Kopplung an Thiole der Cys-Varianten von eADF4(C16)	43
2.4.6.1	Kopplung in Lösung	44

2.4.6.2	Kopplung an assemblierte Filme	45
2.5	Spektroskopische Methoden	46
2.5.1	UV-Vis Absorptionsspektroskopie	46
2.5.2	Fluoreszenzspektroskopie	47
2.5.3	Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie	48
2.5.4	Fouriertransformierte Infrarot- (FTIR-) Spektroskopie	48
2.5.4.1	Fourier-Selbstdekonvolution (FSD)	49
2.5.4.2	Polarisierte FTIR-Spektroskopie	50
2.5.4.3	Auswertung	51
2.5.4.4	Temperaturabhängige FTIR-Messungen	52
2.6	Mikroskopische Methoden	53
2.6.1	Lichtmikroskopie	53
2.6.2	Rasterkraftmikroskopie (AFM)	53
2.6.3	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	54
2.6.4	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	54
2.7	Materialanalytische Methoden	55
2.7.1	Thermogravimetrische Analyse (TGA)	55
2.7.2	Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)	56
2.7.3	Zugmessung	56
2.7.4	Dynamisch mechanische Analyse (DMA)	58
2.7.5	Kontaktwinkelanalyse	59
2.8	Zellkulturtechniken	60
2.8.1	Auftauen, Kultivierung und Einfrieren von Zellen	60
2.8.2	Vitalitäts-Test WST (<i>water soluble tetrazonium</i>)-1	61
2.8.2.1	Filmpräparation	61
2.8.2.2	Adhäsionstest	62
2.8.2.3	Proliferationstest	62
3	Ergebnisse	63
3.1	Charakterisierung von eADF4(C16) Filmen	63
3.1.1	Analyse der Sekundärstruktur	64
3.1.1.1	Einfluss verschiedener Lösungsmittel	64
3.1.1.2	Einfluss verschiedener Nachbehandlungsmethoden	68
3.1.1.3	Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit	71
3.1.2	Thermische Stabilität	74
3.1.2.1	Thermogravimetrische Analyse	74

3.1.2.2	Analyse mittels dynamischer Differenzkalorimetrie	76
3.1.2.3	Einfluss der Temperatur auf die Sekundärstruktur	78
3.1.3	Mechanische Charakterisierung	80
3.1.3.1	Zugbelastung.....	80
3.1.3.2	Dynamisch mechanisches Verhalten.....	82
3.1.3.3	Orientierung der Moleküle unter Zugbelastung.....	84
3.1.4	Charakterisierung der Filmoberfläche	88
3.1.4.1	Topographie	88
3.1.4.2	Benetzbarkeit/Hydrophobizität	92
3.2	Modifizierung und Funktionalisierung von eADF4(C16).....	93
3.2.1	Herstellung und Charakterisierung von Cystein-Varianten von eADF4(C16)	93
3.2.1.1	Design, Expression und Reinigung	93
3.2.1.2	Analyse der Sekundärstruktur	96
3.2.1.3	Charakterisierung des Dimerisierungsverhaltens.....	96
3.2.2	Kopplung in Lösung	99
3.2.2.1	Kopplung von Fluorescein-Maleimid	99
3.2.2.2	Modifikation mit zyklischem RGD-Peptid c(RGDfK)	100
3.2.3	Modifikation und Funktionalisierung von Filmen aus Cystein-Varianten von eADF4(C16).....	102
3.2.3.1	Strukturelle Charakterisierung der Filme	102
3.2.3.2	Filmmodifikation	103
3.3	Untersuchung potentieller Anwendungen von (modifizierten) eADF4(C16)-Filmen	107
3.3.1	Analyse der Biokompatibilität in Zellkultur-Untersuchungen	107
3.3.1.1	Generelle Parameter der Filmpräparation und Zellkultivierung	108
3.3.1.2	Einfluss des Lösungsmittels.....	108
3.3.1.3	Einfluss der Nachbehandlung	110
3.3.1.4	Modifikation mit c(RGDfK)-Maleimid	113
3.3.2	eADF4(C16) Filme als Oberflächenbeschichtung – Einfluss des Substrats auf die Oberflächeneigenschaften	115
3.3.2.1	Hydrophobizität	115
3.3.2.2	Topographie	116
3.3.2.3	Sekundärstruktur	117
4	Diskussion.....	119
4.1	Einfluss verschiedener Parameter auf die eADF4(C16) Sekundärstruktur in Filmen	120
4.1.1	Einfluss des Lösungsmittels	120

4.1.2	Einfluss chemischer und physikalischer Nachbehandlungsmethoden.....	121
4.2	Beeinflussung makroskopischer Eigenschaften	124
4.2.1	Chemische und thermische Beständigkeit	124
4.2.2	Topographie	124
4.2.3	Mechanische Eigenschaften und Rückschlüsse auf molekulare Anordnung.....	125
4.3	Modifizierung und Funktionalisierung von Spinnenseidenfilmen	129
4.4	Einstellen definierter Oberflächeneigenschaften	133
4.5	Biokompatibilität von eADF4(C16) Filmen – <i>in vitro</i> Zellkulturexperimente	136
4.6	Eigenschaften und Potential der untersuchten Spinnenseidenfilme im Vergleich zu <i>B. mori</i> Seidenfibroin-Filmen bzw. anderen Materialien	140
5	Zusammenfassung.....	145
6	Summary	149
7	Literatur.....	151
8	Abkürzungen	169
9	Publikationen.....	171
10	Anhang	173
10.1	Spannung bei schrittweiser Dehnung von eADF4(C16)-Filmen.....	173
10.2	REM Aufnahmen der Filmoberfläche	174
10.3	Massenspektren	176
10.4	Vektorkarten	178
10.5	Proteinsequenzen	180
10.6	Hydrophathizitätsblot.....	181

1 Einleitung

1.1 Protein-basierte Materialien

Proteine bilden durch ihre zahlreichen Funktionen die Grundlage allen Lebens. Neben der Katalyse biochemischer Reaktionen (Enzyme) und der Fähigkeit zu gezielten Rezeptor-Ligand-Interaktionen dienen sie zum Transport und der Signaltransduktion. Darüber hinaus ermöglichen sie aktive Bewegungen und stellen als Strukturproteine die strukturelle und mechanische Integrität von Zellen und Gewebe sicher.

Seit einigen Jahren werden Proteine zunehmend auch als Ausgangsstoffe zur Entwicklung innovativer technischer Materialien wahrgenommen. Extrazelluläre Strukturen wie die der Diatomeen oder Schwämme, sowie biologische Superklebstoffe von Muscheln oder auch mechanische Hochleistungsfasern wie die der Seiden oder Muschelbyssusfäden dienen dabei aufgrund ihrer perfekt auf den jeweiligen Zweck angepassten Funktionalität und Effektivität als Vorbilder für Proteinmaterialien.

Im Mittelpunkt des Interesses von Materialwissenschaftlern stehen dabei viele natürliche Proteinfasern, welche sich durch außergewöhnliche mechanische Eigenschaften auszeichnen (Buehler & Yung, 2009). Untersuchungen der zugrundeliegenden Struktur-Funktions-Beziehungen in solchen Faserproteinen erlauben beispielsweise eine Verknüpfung der molekularen Zusammensetzung mit der Mechanik des biologischen Materials. Dieses Kenntnis ermöglicht eine potentielle Nutzung natürlicher und rekombinant hergestellter/artifizierlicher Proteine oder Peptide für neuartige Materialien mit entsprechend einstellbaren Eigenschaften (Cranford & Buehler, 2010; Zelzer & Ulijn, 2010; Kushner & Guan, 2011).

Intrinsische Eigenschaften wie die Biokompatibilität und Abbaubarkeit der (meisten) Proteine bei einem relativ geringen spezifischen Gewicht sowie eine einfache Prozessierbarkeit (Widhe *et al.*, 2011; Kushner & Guan, 2011) werden insbesondere in der Medizin geschätzt. Darüber hinaus zeichnen sich Proteine aus materialwissenschaftlicher Sicht im Gegensatz zu synthetischen Polymeren durch Monodispersität der Moleküle und deren Fähigkeit zur Selbstassemblierung aus (van Hest & Tirrell, 2001; Sanford & Kumar, 2005). Dies ermöglicht eine Kontrolle der chemischen Zusammensetzung aber auch der supramolekularen Ordnung in einem System.

1.1.1 Anwendungsbeispiele und Forschungsaktivitäten

Eine bereits seit Jahrhunderten vom Menschen in der Textilindustrie genutzte Proteinfaser ist die aus dem Kokon des Maulbeerspinners *Bombyx mori* gewonnene Seide. Um die vielfältigen Eigenschaften dieser und weiterer Strukturproteine für neue Materialien zu nutzen, können die Proteine entweder aus dem Naturstoff gewonnen und direkt bzw. in modifizierter Form verwendet werden. Alternativ können davon abgeleitete oder inspirierte Proteine rekombinant oder auch synthetisch hergestellt werden, was eine gezielte Kombination und Modifikation spezifischer Eigenschaften ermöglicht (Sanford & Kumar, 2005). Verschiedene Assemblierungsprozesse ermöglichen die Bildung diverser Morphologien aus den jeweiligen Ausgangsproteinen/-peptiden. Zusätzlich bieten chimäre Proteine, Blends oder Hybridmaterialien wie Peptid-Polymer-Amphiphile (zusammengefasst z. B. in Zelzer & Ulijn, 2010; Versluis et al., 2010) vielfältige Anwendungsmöglichkeiten. Diese reichen dabei von biomedizinischen Applikationen über die Nahrungsmittelindustrie bis hin zu biologisch verträglichen elektronischen Sensoren und leitenden Strukturen. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über ausgewählte Proteine bzw. Peptide, deren jeweils gewählte Prozessierungsform sowie potentielle oder bereits etablierte Anwendungsfelder gemäß dem Stand der aktuellen Forschung.

1.1.2 Strukturelle Grundlagen mechanischer Eigenschaften

Viele Strukturproteine zeigen eine hierarchische Zusammensetzung (z. B. Quartärstruktur, Fibrillen/Filamente, Fasern) sowie einen modularen Aufbau aus repetitiven, meist wenig komplexen Wiederholungseinheiten (Kushner & Guan, 2011; Csete & Doyle, 2002). Lineare mechanische (Zug-)Belastung von Proteinfasern führt einerseits zum Entfalten oder Gleiten von Molekülketten und andererseits zum Aufbrechen von Bindungen. Betroffen sind dabei Wasserstoffbrückenbindungen, quervernetzende kovalente Bindungen sowie intermolekulare Verschlaufungen (Buehler & Yung, 2009). Die jeweiligen mechanischen Eigenschaften von Proteinfasern, die sich z. B. in ihrer Elastizität, Festigkeit oder Energiespeicherkapazität unterscheiden, lassen sich oftmals gut mit unterschiedlichen Sekundärstrukturelementen korrelieren. Im Folgenden werden beispielhaft Proteinfasern vorgestellt, welche sich durch unterschiedliche mechanische Charakteristika auszeichnen und von unterschiedlichen Sekundärstrukturen dominiert werden.

Tabelle 1.1: Übersicht über ausgewählte Protein-basierte Materialien und potentielle Anwendungsfelder.

Protein/Molekül		Prozessierungsform	Anwendungsfelder	Referenzen
Elastin				
Tropoelastin (solubilisiert)		Vliese	Tissue Engineering (Weichteilgewebe)	(Li <i>et al.</i> , 2005)
Elastin (solubilisiert)		Mikrokapseln (<i>Lyophilisomen</i>)	Bioaktive Kapseln	(Daamen <i>et al.</i> , 2007)
Elastin-mimetische Block-Copolymere		Beschichtungen	Gefäßprothesen	(Jordan <i>et al.</i> , 2007; Woodhouse <i>et al.</i> , 2004)
		Hydrogele	Stimulierbare Materialien (Temperatur/pH/Ionen abhängig), z. B. Wirkstofftransport	(Moriyama <i>et al.</i> , 2005; Lao <i>et al.</i> , 2007; Meyer <i>et al.</i> , 2001; Dreher <i>et al.</i> , 2003)
		Nano-/Mikropartikel	Wirkstoffverkapselung, Gentherapie	(Wright & Conticello, 2002; Chen <i>et al.</i> , 2008)
Blends mit	PLGA [#] , Gelatin	Vliese	Tissue Engineering	(Li <i>et al.</i> , 2006)
	SF [‡] (Peptide)	Hydrogele	Gerichtete Gentherapie	(Haider <i>et al.</i> , 2005; Megeed <i>et al.</i> , 2004)
	SF	Poröse Filme	Biomaterialien/Zellsupport	(Hu <i>et al.</i> , 2010)
Keratin				
extrahiert aus Haar		Hydrogele	Arterienklemme (Hemostat)	(Aboushwareb <i>et al.</i> , 2009)
		Hydrogele	Tissue Engineering, Nervenregeneration	(de Guzman <i>et al.</i> , 2011; Sierpinski <i>et al.</i> , 2008)
		Hydrogel/poröse <i>Scaffolds</i>	Tissue Engineering	(Hill <i>et al.</i> , 2010; Srinivasan <i>et al.</i> , 2010)
Blend mit	SF	Filme	Tissue Engineering/Wirkstofftransport	(Vasconcelos <i>et al.</i> , 2008)
Kollagen				
Gelatin		Hydrogele	Wirkstofftransport (z. B. Knochenregeneration)	(Sakai <i>et al.</i> , 2009; Young <i>et al.</i> , 2005; Hwang <i>et al.</i> , 2011; Kempen <i>et al.</i> , 2008)
			Hautersatz, Wundabdeckung	(Sheila, 2008; Boateng <i>et al.</i> , 2008)
aus Zellkultur bzw. Peptide		Hydrogele	Kosmetik	(Baumann <i>et al.</i> , 2006; Sadick & Sorhaindo, 2007)
Blends mit	Chitosan/PLGA/ Polycaprolacton	Vliese	Hautersatz	(Franco <i>et al.</i> , 2011)
Muschelbyssus-Proteine (z. B. aus <i>Mytilus edulis</i>)				
Mefp-1	rekombinant		Kleber (z. B. für Weichteilgewebe)	(Ninan <i>et al.</i> , 2003; Frank & Belfort, 2002)
	+ PEG*		Antifouling (Schutz vor Biokorrosion)	(Dalsin <i>et al.</i> , 2003)
Seidenproteine				
<i>Seidenfibroin (SF) Bombyx mori</i>				
gereinigt (Sericin-frei)		Fasern	Textilien, Tissue Engineering	Zusammengefasst in (Hardy <i>et al.</i> , 2008)
regeneriert bzw. rekombinant		Vliese, Fasern, Partikel, Membranen, Schäume, Hydrogele	Biomedizinische Applikationen (Tissue Engineering, Wirkstofftransport, Gentherapie)	(Numata & Kaplan, 2010; Vepari, 2007; Altman <i>et al.</i> , 2003; Wang <i>et al.</i> , 2006)
Block-Copolymere			Biosensorik, Biophotonik, Mikrofluidik-Einheiten	(Rabotyagova <i>et al.</i> , 2011)
				(Filme s. Tabelle 1.3 und 1.4)
<i>SF aus Antheraea. pernyi, A. mylitta, Samia cynthia ricini</i>				
		Film, Vliese, poröse Matrices	Tissue Engineering, Wirkstofftransport	(Kundu <i>et al.</i> , 2012)
Spinnenseidenproteine				
natürlich		Fäden	Nervenregeneration	(Allmeling <i>et al.</i> , 2008; Radtke <i>et al.</i> , 2011)
rekombinant		Mikropartikel	Wirkstoff-Freisetzung	(Lammel <i>et al.</i> , 2011)
rekombinant		Kapseln	Verkapselung	(Hermanson <i>et al.</i> , 2007a)
rekombinant		Fasern, Filme, Vliese, 3D <i>Scaffolds</i>	Zellwachstum (potentiell Tissue Engineering) künstliche Gefäße	(Widhe <i>et al.</i> , 2010; Fredriksson <i>et al.</i> , 2009; Agapov <i>et al.</i> , 2009; Xiang <i>et al.</i> , 2011)
rekombinant		+ Polylysin/ RGD ^{‡‡}	Gerichtete Gentherapie	(Numata <i>et al.</i> , 2012; Numata <i>et al.</i> , 2011)
rekombinant		+Silaffin (R5-Peptid)	Biomineralisierung	(Foo <i>et al.</i> , 2006)
rekombinant		Filme	v. a. Zellwachstum	s. Tabelle 1.5
Soja Protein, Zein				
isoliert		Film/Membran	Essbare Verpackung/Nahrungsmittelindustrie	(Guerrero <i>et al.</i> , 2010; Pruneda <i>et al.</i> , 2008)
Amyloide				
Diphenylalanin aus Amyloid-β		Nanoröhren	Nanodrähte, elektrochemische Biosensoren	(Adler-Abramovich <i>et al.</i> , 2006; Reches & Gazit, 2003; Reches & Gazit, 2006; Yemini <i>et al.</i> , 2004)
Sup35		Fibrillen	Nanodrähte	(Scheibel <i>et al.</i> , 2003)
Hybridmaterialien / Peptid-Polymer Amhiphile				
Polylysin	+ Poly-THF [†]	Nanoröhren	Gentherapie	(Tian <i>et al.</i> , 2008)
Polylysin	+ PEG/ Poly-Butadien	Mizellen	Wundabdeckung, Wirkstofftransport, Implantatbeschichtung	(Deng <i>et al.</i> , 2007; Gebhardt <i>et al.</i> , 2007)
7-8 mer Peptid	+ Aspartat	Nanoröhren, Vesikel	Biologische Detergenzien (lipid-frei)	(Vauthey <i>et al.</i> , 2002)
Octreotide	+ DOTA ^{‡‡} / + Alkylkette	Mizellen	Bildgebung	(Morisco <i>et al.</i> , 2009)

[#]PLGA: Polylactid-co-Glycolid, [‡]SF: Seidenfibroin, ^{*}PEG: Polyethylenglycol, ^{**}RGD: Zelladäsionssequenz (Arg-Gly-Asp), [†]THF: Tetrahydrofuran, ^{‡‡}DOTA: 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure

1.1.2.1 β -Schleifen: elastische Struktur gezeigt am Beispiel Elastin

Elastinfasern zeichnen sich durch eine extrem hohe Elastizität und Resilienz aus, d. h. das Material kann bei Verformung viel Energie speichern, ohne dass diese verloren geht (Urry *et al.*, 2002). Diese Eigenschaft wird hauptsächlich auf in der Struktur vorhandene β -Schleifen zurückgeführt.

Tropoelastin, die lösliche Vorstufe des extrazellulären Elastins, besteht aus alternierenden hydrophoben Domänen und quervernetzenden Einheiten. Letztere sind reich an Alanin und Lysin und bilden vermutlich α -Helices aus (Gray *et al.*, 1973). Durch Desaminierung der Lysinreste verschiedener Moleküle entstehen kovalente Quervernetzungen zwischen den Ketten, welche das extrazellulär gebildete, polymere Elastin-Netzwerk stabilisieren (Abb. 1.1) (Brown-Augsburger *et al.*, 1995; Keeley *et al.*, 2002; Vrhovski & Weiss, 1998). Die hydrophoben Domänen bestehen hauptsächlich aus kurzen Wiederholungseinheiten der Aminosäuren Glycin, Prolin, Leucin und Valin, angeordnet z. B. in dem Pentapeptid VPGXG (wobei X häufig V entspricht), dem Hexapeptid GVG VAP und dem Tetrapeptid VPGG (Sandberg *et al.*, 1985; Yeh *et al.*, 1987). CD- und NMR-Untersuchungen an synthetischen Peptiden ergaben, dass $(VPGVG)_n$ bei Überschreiten einer kritischen Temperatur Typ II β -Schleifen mit einer Wasserstoffbrücke zwischen Position 1 und 4 bildet (Reiersen *et al.*, 1998; Cook *et al.*, 1985; Urry *et al.*, 1975; Urry *et al.*, 1985). Dem Modell von Urry *et al.* zufolge ordnen sich diese β -Schleifen zu regelmäßigen β -Spiralen an (Urry *et al.*, 2002; Venkatachalam & Urry, 1981), einer Struktur, die oft als molekulare Springfeder bezeichnet wird und beispielsweise auch in der elastischen Spinnenseide der Fangspirale postuliert wird (Becker *et al.*, 2003; Hayashi & Lewis, 1998).

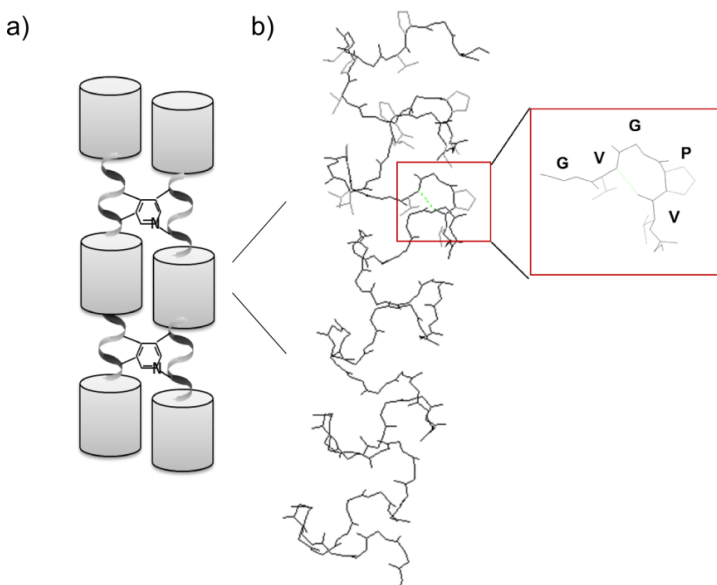


Abb. 1.1: Aufbau von Elastin.

(a) Schematische Darstellung des Aufbaus aus alternierenden hydrophoben und quervernetzenden Einheiten. Die kovalente Quervernetzung erfolgt über Lysin-Reste, wobei typischerweise vier Lysinreste Pyridinstrukturen wie Desmosin und Isodesmosin bilden. (b) Für das Pentapeptid $(VPGVG)_n$ postulierte Struktur der β -Spirale.

(Abbildung erstellt mit SwissPdb-Viewer anhand einer Struktur von Li *et al.* (Li *et al.*, 2001)).

Der zugrunde liegende Mechanismus der Elastizität wird in der Literatur kontrovers diskutiert, jedoch wird bei allen Arbeiten ein Entropie-elastisches Verhalten favorisiert. Dies könnte auf der Exposition verborgener hydrophober Reste bei mechanischer Streckung basieren, was zu einer Verminderung der Entropie des umgebenden Wassers führt (Weis-Fogh & Anderson, 1970). Urry *et al.* postulieren die Dämpfung oder Einschränkung der Ketten-internen Dynamik unter Zugbelastung als Ursprung der Elastizität. So wurden für die Aminosäuren, welche die Schleifen innerhalb der β -Spirale verbinden, Oszillationen nachgewiesen, deren Amplitude bei mechanischer Streckung stark abnahm (Urry & Parker, 2002; Henze & Urry, 1985).

1.1.2.2 Coiled-coil Struktur: Enthalpie-elastisches Verhalten gezeigt an Intermediärfilamenten

Im Gegensatz zu Elastin zeigen die Intermediärfilament-Proteine Vimentin oder Keratin eher Enthalpie-elastisches Verhalten. Neben mechanischer Stabilität zeichnen sie sich durch eine hohe Toleranz gegenüber Defekten im System aus (Ackbarow & Buehler, 2009).

Beide Proteine bestehen aus einer langen α -helikalen stäbchenförmigen Mitteldomäne und nicht-helikalen Termini (Fuchs & Weber, 1994). Jeweils zwei α -helikale Stränge winden sich umeinander und bilden so eine dimere *coiled-coil*-Struktur aus (s. Abb. 1.2). Typischerweise tritt dabei eine heptamere Wiederholungseinheit (*abcdefg*) in der Primärsequenz auf, wobei die Positionen a und d von unpolaren/hydrophoben Resten eingenommen werden (Abb. 1.2 a) (O'Shea *et al.*, 1992; Strelkov *et al.*, 2003). Aufgrund der α -helikalen Geometrie mit 3,6 Aminosäuren pro Windung treffen diese an einer Seite der Helix zusammen und stellen die Interaktionsfläche zur Ausbildung der superhelikalen Struktur dar. In der weiteren Hierarchie von Vimentin lagern sich zwei solcher dimeren *coiled-coils* zu einem anti-parallellem Tetramer zusammen (Strelkov *et al.*, 2003).

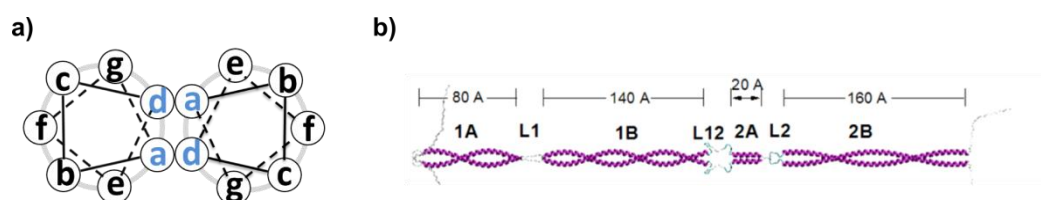


Abb. 1.2: Coiled-coil Strukturen. (a) Schematische Darstellung der Anordnung der typischen heptameren Wiederholungseinheit (*abcdefg*) in der Aufsicht. Die Reste an den Positionen a und d bilden dabei eine hydrophobe Interaktionsfläche. (b) Aufbau von Vimentin aus einer langen α -helikalen stäbchenförmigen Mitteldomäne und nicht-helikalen Termini. Gezeigt ist die daraus gebildete dimere *coiled-coil*-Struktur. A und B bezeichnen individuelle Domänen, welche *coiled-coils* ausbilden. Diese sind durch kurze Linker (L) verbunden. (Qin *et al.*, 2009a, doi/10.1371/journal.pone.0007294.g002, mit Genehmigung durch die Creative Commons Attribution License).

MD Simulationen des mechanischen Verhaltens von Vimentin unter Zugbelastung zeigen in Übereinstimmung mit experimentellen Daten drei Abschnitte (Kreplak *et al.*, 2008; Qin *et al.*, 2009a; Qin *et al.*, 2009b). Extern angelegte Zugkraft führt zunächst zur Ausrichtung und Dehnung der *coiled-coil* Segmente, wobei ein linearer Kraftanstieg beobachtet wird. Die superhelikale Quartärstruktur ermöglicht dabei eine Dehnung um fast das doppelte als bei einer einzelnen α -Helix (Qin *et al.*, 2009a). Anschließend erfolgt durch Aufbrechen von intrahelikalen Wasserstoffbrücken (meist in Clustern von 3-4) eine schrittweise Entfaltung der α -helikalen Segmente, wodurch Energie dissipiert wird (Ackbarow *et al.*, 2007). Die Streckung der Helixwindungen ist hierbei die Grundlage für die beobachtete Dehnbarkeit auf über 100 %. Im Fall von Vimentin und Keratin konnte gezeigt werden, dass die mechanisch induzierte Entfaltung superhelikaler Bereiche zur anschließenden Ausbildung von intermolekularen β -Faltblättern führt, was einen entscheidenden Gewinn an Festigkeit im Vergleich zu isolierten α -Helices darstellt (Qin *et al.*, 2009a; Fudge *et al.*, 2003; Kreplak *et al.*, 2004). Bei weiterer Dehnung schließlich gleiten die zu Tetrameren angeordneten Dimere aneinander bevor das Material versagt (Qin *et al.*, 2009a).

1.1.2.3 β -Faltblatt-reiche Proteine

Fasern aus Strukturproteinen mit hohem β -Faltblatt-Anteil zeichnen sich durch außergewöhnlich hohe Zugfestigkeit und einen hohen E-Modul sowie Stabilität gegenüber Umweltfaktoren aus, besitzen dafür aber nur begrenzte Dehnbarkeit (Smith *et al.*, 2006; Smith, 2010; Ketten & Buehler, 2008a). Beispiele hierfür sind Amyloid(-ähnliche) Proteinfasern, im Muskel vorkommende Titinfasern oder Seidenfäden. Bemerkenswert ist dabei, dass die Festigkeit dieser Fasern die von Stahl erreichen kann (Smith *et al.*, 2006), obwohl die Molekülinteraktion auf Wasserstoffbrücken beruht, einer mit etwa 8-20 kJ/mol (Sheu *et al.*, 2003; Xu & Buehler, 2010) *per se* schwachen, nicht-kovalenten Bindung. Einen wichtigen Beitrag liefert allerdings die Anisotropie des Materials (Brockwell *et al.*, 2003): Die zur Entfaltung eines antiparallelen Faltblatts aus zehn Alaninresten benötigte Kraft variiert um eine Zehnerpotenz zwischen longitudinaler und orthogonaler Belastung (Rohs *et al.*, 1999).

Die außergewöhnlichste Kombination von mechanischen Eigenschaften weisen Seidenfasern, und insbesondere der von einigen Spinnen produzierte Abseilfaden (*dragline* Seide), auf (Tabelle 1.2). Die Fäden sind einerseits sehr zugfest, dabei jedoch noch bis zu etwa 30 % dehnbar, wodurch eine Zähigkeit erreicht wird, welche die von technischen Hochleistungsfasern wie Kevlar sogar übertrifft (Gosline *et al.*, 1999).

Tabelle 1.2: Vergleich mechanischer Eigenschaften ausgewählter Materialien (nach Gosline *et al.*, 1999). LF: relative Luftfeuchtigkeit

Material	Dichte	Zugfestigkeit	E-Modul (Steifigkeit)	Dehnbarkeit	Zähigkeit
	g/cm ³	GPa	GPa	%	MJ/m ³
Abseilfaden (<i>A. diadematus</i>)	1,3	1,1	10	27	160
Kokon-Seide (<i>B. mori</i>)	1,3	0,6	7	18	70
Elastin	1,3	0,002	0,001	150	1,6
Wolle (bei 100 % LF)	1,3	0,2	0,5	50	60
Kollagen	1,3	0,15	1,5	12	7,5
Kevlar 49	1,4	3,6	130	2,7	50
Hochfester Stahl	7,8	1,5	200	0,8	6
Carbonfaser	1,8	4	300	1,3	25

Im Vergleich zu anderen β -Faltblatt-reichen Proteinfasern weisen Seiden einige Besonderheiten auf. Zum einen sind die β -Faltblatt-Bereiche hier in eine flexiblere „amorphe“ Matrix eingebettet (s. Kapitel 1.2.1, Abb. 1.3), zum anderen unterliegt ihre Assemblierung einem komplexen Spinnvorgang.

1.2 Spinnenseide

Als Seiden werden generell Proteine mit hochrepetitiver Aminosäuresequenz (reich an Glycin, Alanin und Serin) bezeichnet, welche in flüssiger Form gespeichert werden und durch Extrudieren oder Verspinnen, d. h. unter Aufwenden von Scherkräften, zu Fasern assemblieren (Craig, 1997). Seidenproteine werden von verschiedenen Klassen der *Arthropoda* (Gliederfüßer) produziert (Craig, 1997). Am umfassendsten charakterisiert wurden bisher zwei Seidenarten: 1. Die Seide des Maulbeerspinners *B. mori*, welche aus einer schweren (Mw ~390 kDa) und einer leichten Kette (Mw ~26 kDa) des Seidenfibroins sowie dem Protein P25 (Mw 25 kDa) zusammengesetzt ist (Vepari, 2007; Inoue *et al.*, 2000). Der daraus gebildete Doppelfaden ist zudem von einer Hülle aus Serin-reichen Proteinen, den Sericinen, umgeben (Inoue *et al.*, 2000; Shao & Vollrath, 2002; Takasu *et al.*, 2002). 2. Der Abseilfaden (*dragline* Seide) von Radnetz-bildenden Spinnen. Neben seiner Rolle als Abseil- und Rettungsfaden dient er zur Fertigung der Rahmenkonstruktion sowie der Speichen eines Radnetzes (Vollrath, 2000). Entsprechend seiner Funktion weist er die größte mechanische Belastbarkeit (Zähigkeit) unter den bekannten Seidentypen auf.

1.2.1 Aufbau und Struktur von *dragline* Seide

Ein *dragline*-Seidenfaden zeigt einen hierarchischen Aufbau (Abb. 1.3) (Heim *et al.*, 2010). Makroskopisch lässt sich eine Hülle und ein Kernbereich unterscheiden (Frische *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1994), wobei die Hülle aus einer Lipidschicht, Glykoproteinen sowie der in der kleinen Ampullendrüse (*minor ampullate*) gebildeten Seide besteht. Diese Hülle bietet Schutz gegen Austrocknung sowie gegen Befall mit Mikroorganismen (Liu *et al.*, 2005; Sponner *et al.*, 2007). Im Kernbereich finden sich – vergleichbar zu anderen Strukturproteinen – Fibrillen, die entlang der Faserrichtung ausgerichtet sind und aus mindestens zwei Proteinen bestehen (Augsten *et al.*, 2000; van Beek *et al.*, 2002). Typischerweise werden Spinnenseidenproteine als Spidroine (abgekürzt durch Sp) bezeichnet, wobei sich der Name von der Drüse ableitet, in der sie gebildet werden. Die beiden Proteine der *dragline* Seide, welche in der großen Ampullendrüse (*major ampullate gland*) gebildet werden, werden daher MaSp1 und MaSp2 genannt. Beide Proteinklassen unterscheiden sich in ihrer Hydrophobizität sowie ihrem Prolin-Gehalt. Gemäß der Einteilung bezüglich des Prolin-Gehalts stellen die entsprechenden Proteine der Europäischen Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* (hier ADF3 und ADF4 genannt, entsprechend *A. diadematus* Fibroin) mit etwa 16 % Prolin beide MaSp-2 ähnliche Vertreter dar (Gatesy *et al.*, 2001; Guerette *et al.*, 1996). Allerdings weisen sie Unterschiede in ihrer Hydrophobizität auf (Huemmerich *et al.*, 2004b). Möglicherweise stellen weitere Proteine, wie etwa das bislang der Kokonseide von *A. diadematus* zugeordnete ADF2, ein MaSp1-Homolog dar (Hayashi *et al.*, 1999).

Neben diesen Unterschieden weisen MaSp1 und MaSp2 charakteristische Gemeinsamkeiten auf. Ihr Molekulargewicht liegt bei etwa 250-350 kDa (Hinman & Lewis, 1992; Ayoub *et al.*, 2007), sie bestehen zu über 50 % aus den Aminosäuren Glycin und Alanin und sie zeigen den Aufbau eines Multiblock-Copolymers (Heim *et al.*, 2009; Humenik *et al.*, 2011; Hayashi *et al.*, 1999). Dabei wird eine hochrepetitive Kernregion von kurzen, 100-140 Aminosäuren umfassenden, nicht-repetitiven Termini flankiert, welche hochkonserviert sind (Rising *et al.*, 2006; Eisoldt *et al.*, 2011; Challis *et al.*, 2006; Motriuk-Smith *et al.*, 2005). Die 3D-Struktur dieser Termini wurde kürzlich aufgeklärt (Hagn *et al.*, 2010; Askarieh *et al.*, 2010; Hagn *et al.*, 2011). Bei beiden Termini handelt es sich um globuläre Domänen, bestehend aus fünf α -Helices. Beide terminalen Domänen können dimerisieren, wobei die carboxyterminale Domäne zusätzlich durch Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke stabilisiert wird (Eisoldt *et al.*, 2011; Huemmerich *et al.*, 2004a).

Die repetitive Kerndomäne setzt sich aus kurzen Modulen von etwa 20-40 Aminosäuren zusammen, welche sich bis zu hundert Mal wiederholen können (Ayoub *et al.*, 2007; Hinman

& Lewis, 1992; Guerette *et al.*, 1996). Die darin wiederkehrenden Konsensusmotive umfassen Alanin-reiche Regionen (meist Polyalanin (A_n mit $n=4-12$), seltener in Kombination mit Glycin (GA_n), sowie die Motive GGX (mit $X=Y,L,Q$) und GPGXX (mit $X=Q,G,Y$) (Hayashi *et al.*, 1999; Gosline *et al.*, 1999). NMR- und Röntgenbeugungsanalysen ergaben, dass die Polyalanin-Sequenzen bevorzugt β -Faltblatt-Struktur bilden, die sich teilweise zu hochgeordneten Nanokristallen aus antiparallel angeordneten β -Strängen zusammenlagern (Riekell *et al.*, 1999; Parkhe *et al.*, 1997; Simmons *et al.*, 1994; Simmons *et al.*, 1996; Kummerlen *et al.*, 1996; Grubb & Jelinski, 1997). Das GPGXX-Motiv hingegen bildet vermutlich β -Schleifen, welche sich – ähnlich wie für Elastin angenommen – zu Spiralen anordnen (Hayashi & Lewis, 2001; Hayashi *et al.*, 1999). Die Struktur des Motivs GGX ist nicht eindeutig geklärt. Aufgrund von NMR-Studien wird jedoch von weniger geordneten, helikalen Strukturen ausgegangen, wie etwa 3_1 -Helices (Strukturen mit drei Aminosäuren pro Windung, welche keine intra-molekulare H-Brücken ausbilden, wie etwa Polyprolin II- oder Polyglycin II-Helices) (Jenkins *et al.*, 2010; Holland *et al.*, 2008a; van Beek *et al.*, 2002).

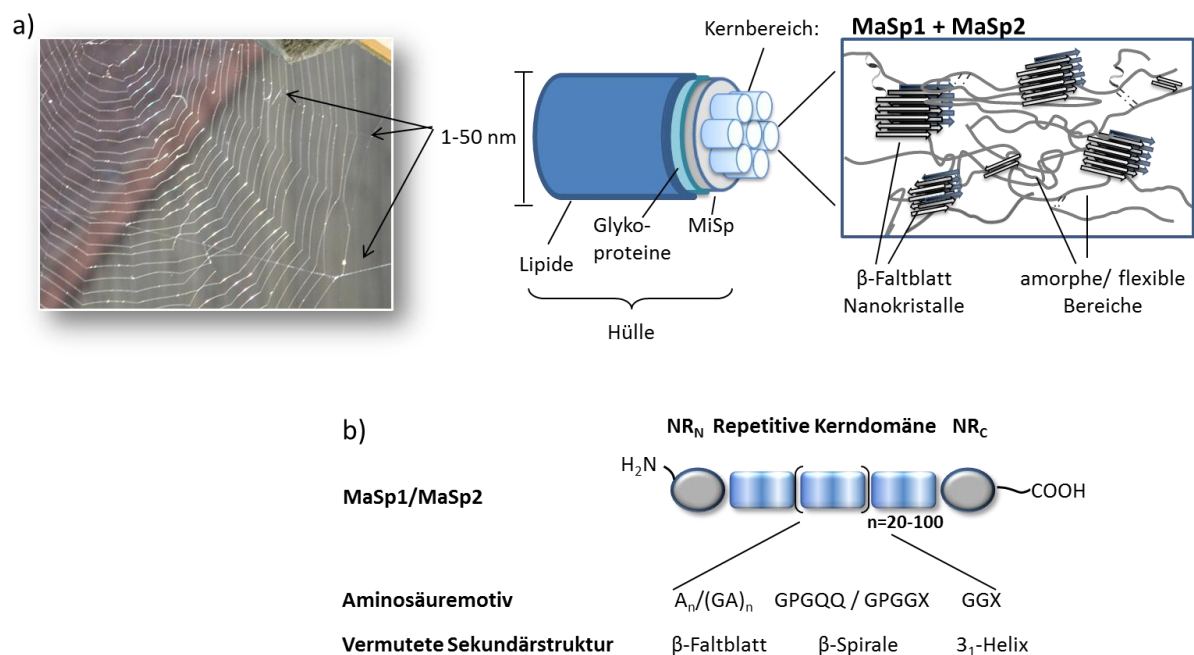


Abb. 1.3: Hierarchischer Aufbau eines *dragline* Seidenfadens. (a) *Dragline* Seide dient als Abseilfaden sowie zur Konstruktion von Rahmen und Speichen eines Radnetzes. Makroskopisch gliedert sie sich in eine Hülle, bestehend aus Lipiden, Glykoproteinen und Seidenproteinen der kleinen Ampullendrüse (*minor ampullate* Spidroin, MiSp), sowie den Kernbereich. Dieser zeigt Fibrillen, welche aus (mindestens) zwei Proteinen der großen Ampullendrüse (MaSp1 und MaSp2) aufgebaut sind. Auf mikroskopischer Ebene finden sich Nanokristalle aus dicht gepackten β -Faltblättern, die in einer Matrix aus flexibleren Strukturen eingebettet sind. (b) Schematische Darstellung des modularen Aufbaus von MaSp1 bzw. MaSp2. Eine hochrepetitive Kerndomäne wird an beiden Termini von nicht-repetitiven Domänen (NR_N und NR_C) flankiert. Die Kerndomäne umfasst bis zu 100-fach auftretende Wiederholungseinheiten, welche wiederum aus kurzen Aminosäuremotiven zusammengesetzt sind. Einzelnen Motiven konnten bestimmte Sekundärstrukturen zugeordnet werden (s. Text).

1.2.2 Hierarchischer Aufbau als Grundlage mechanischer Eigenschaften

Im Seidenfaden liegen die hochgeordneten, kristallinen Bereiche aus dicht gepackten β -Faltblatt-Strukturen in einer Matrix aus weniger orientierten, lose verschränkten/verwobenen Proteinketten vor (Abb. 1.3) (van Beek *et al.*, 2002; Termonia, 1994). Diese Anordnung liefert einen wichtigen Beitrag zum außergewöhnlichen mechanischen Verhalten der Seidenfasern. Röntgenbeugungsanalysen ergaben eine Größe der Kristalle von etwa $2 \times 5 \times 7$ nm (Riek *et al.*, 1999; Grubb & Jelinski, 1997). Ihr Anteil am Gesamtvolumen des Fadens beträgt 15-35 % (Grubb & Jelinski, 1997; Jenkins *et al.*, 2010; Lefevre *et al.*, 2007b). Wie bei anderen semikristallinen Materialien wirken die starren Kristalle als physikalische Quervernetzung, was dem Faden mechanische Stabilität verleiht (Xiao *et al.*, 2009; Rief *et al.*, 1997; Eom *et al.*, 2003; Buehler & Yung, 2009). Der Grad der Steifigkeit (E-Modul) variiert dabei in Abhängigkeit des Anteils kristalliner Strukturen sowie deren Ausrichtung (Du *et al.*, 2006; Rousseau *et al.*, 2007; Sinsawat *et al.*, 2002; Teulé *et al.*, 2011). Auch für andere β -Faltblatt-reiche Proteine (z. B. Titin) wurde beschrieben, dass intermolekulare β -Faltblatt-Regionen den Zusammenhalt zwischen verschiedenen Molekülketten vermitteln, diese verstärken und bei Beanspruchung zur Verteilung der Kraft führen (Keten *et al.*, 2010; Rief *et al.*, 1997). Der Zusammenhalt innerhalb der Faltblätter ist dabei durch Wasserstoffbrücken gegeben. MD Simulationen ergaben, dass unter homogener Scherbelastung bis zu vier Wasserstoffbrücken kooperativ aufbrechen, was zu dem Schluss führte, dass dies der maximalen Stabilität eines β -Faltblatts entspricht und ein Zugewinn an (Zug-)Festigkeit nicht durch längere β -Stränge, sondern eher durch Kombination vieler kurzer β -Faltblatt-Bereiche erreicht werden kann (Keten *et al.*, 2010; Keten & Buehler, 2008a). Somit bietet die Anordnung vieler räumlich begrenzter β -Faltblatt-Strukturen innerhalb des Seidenfadens die Voraussetzung für hohe Reißfestigkeit. Zudem erlaubt die dreidimensionale Anordnung der Kristalle eine wesentlich bessere Dissipation von Energie als beispielsweise amyloide Strukturen, da die Ableitung in den Kristallen in transversaler Richtung erfolgen kann (Xu & Buehler, 2010).

Einen weiteren entscheidenden Beitrag zu den mechanischen Eigenschaften, welche neben einer hohen Festigkeit auch eine gute Dehnbarkeit beinhalten (Tabelle 1.2), liefert die Matrix aus ungeordneten Strukturen, Helices und β -Spiralen. Wie bereits für Elastin beschrieben, verleihen letztere hohe Elastizität (Hayashi & Lewis, 2001). Auch 3_1 -Helices gelten als flexible Strukturen, die jedoch gleichzeitig eine vergleichsweise höhere Stabilität als rein amorphe Ketten bieten (Jelinski *et al.*, 1999; Kushner & Guan, 2011). Zum Verständnis der Eigenschaften der amorphen Matrix wurden basierend auf dem sog. *worm-like chain*-Modell,

welches zur Beschreibung isotroper, flexibler Moleküle angewendet wird, Simulationen durchgeführt. Mit diesem Modell konnte teilweise gute Übereinstimmung des mechanischen Verhaltens mit experimentellen Daten erreicht werden, jedoch nur in einem begrenzten Kraftbereich. Dies wurde dadurch erklärt, dass bei höherer angelegter Kraft H-Brücken aufbrechen, was in dem verwendeten Modell nicht berücksichtigt wird (Keten & Buehler, 2008b). Verschiedene Studien zeigten, dass die Matrix Bereiche unterschiedlicher Orientierung aufweist und teilweise über H-Brücken quervernetzt ist (van Beek *et al.*, 2002; Jelinski *et al.*, 1999). Daraus leitet sich ein Dreiphasen-Modell der hierarchischen Zusammensetzung von *dragline* Seide ab, welches neben den hoch-orientierten β -Faltblatt-Kristallen eine relativ ungeordnete Matrix sowie teilweise orientierte Polypeptidketten umfasst (van Beek *et al.*, 2002; Simmons *et al.*, 1996; Papadopoulos *et al.*, 2009b). Aus detaillierten, zeit-aufgelösten FTIR-Analysen wurde zudem abgeleitet, dass einige der Ketten (entsprechend einer Gauss-Verteilung) unter Vorspannung stehen (Papadopoulos *et al.*, 2009b; Ene *et al.*, 2009).

1.2.3 Fadenassemblierung – der natürliche Spinnprozess

Die Proteine der *dragline* Seide (MaSp) werden in der großen Ampullendrüse von hochspezialisierten Epithelzellen gebildet und mit Hilfe von Vesikeln in das Lumen der Drüse sekretiert (Plazaola & Candelas, 1991). Eine entsprechende Sekretionssequenz konnte in den aminoterminalen nicht-repetitiven Domänen nachgewiesen werden (Rising *et al.*, 2006). Im Lumen werden die Proteine als hoch viskose Spinnlösung mit Proteinkonzentrationen von bis zu 50 % (w/v) gespeichert, bevor sie bei Bedarf durch einen S-förmigen Spinnkanal zum Ausgang des Spinnapparates, der Spinnwarze, gelangen (Hijirida *et al.*, 1996; Vollrath & Knight, 2001). Im Verlauf der drei Abschnitte des Kanals erfolgt durch Zusammenwirken verschiedener physikalischer und chemischer Trigger der Übergang von einer hoch konzentrierten Lösung in einen festen Faden (Abb. 1.4) (zusammengefasst in Heim *et al.*, 2009; Humenik *et al.*, 2011).

Untersuchungen der Sekundärstruktur der MaSp in der Drüse ergaben *random coil*- sowie dynamische helikale Konformationen, darunter Polyprolin II-Helix-ähnliche Strukturen (Lefevre *et al.*, 2007a). Letztere zeigen die Eigenschaft, dass sie die Löslichkeit der Proteine durch extensive Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu umgebenden Lösungsmittelmolekülen erhöhen (Hijirida *et al.*, 1996). Zum anderen ermöglichen die dabei eingenommenen Diederwinkel eine energetisch günstige Umlagerung in β -Faltblatt-Strukturen (Blanch *et al.*, 2004), welche einen großen Anteil der Struktur (etwa 50 %) im fertigen Faden darstellen (Simmons *et al.*, 1996).

Es wird vermutet, dass sich die MaSp aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften in der Drüse Mizellen-artig arrangieren (Jin & Kaplan, 2003). Dies wird gestützt durch die Beobachtung tröpfchenförmiger Strukturen in der Drüse (Knight & Vollrath, 1999) sowie durch *in vitro* Untersuchungen an rekombinanten, von MaSp abgeleiteten Proteinen (Rammensee *et al.*, 2008; Exler *et al.*, 2007; Hagn *et al.*, 2010). Wie auch für andere Biopolymere bei entsprechend hohen Konzentrationen wurden der Spinnlösung Eigenschaften flüssig-kristalliner Systeme zugeschrieben (Vollrath & Knight, 2001; Willcox *et al.*, 1996; Knight & Vollrath, 2002). Dazu gehört die Fließfähigkeit der Lösung, welche durch erleichterten Transport entlang der Fließrichtung innerhalb des Spinnkanals gekennzeichnet ist. Gleichzeitig weist der Flüssigkeitsfilm eine erhöhte Stabilität auf, die ein Reißen des Stromes verhindert. Durch die Geometrie des sich stetig verjüngenden Spinnapparats wird bis zum Erreichen des letzten Abschnitts ein gleichmäßiger Elongationsfluss erzeugt, welcher die Ausrichtung der Moleküle unterstützt (Knight *et al.*, 2000; Lefevre *et al.*, 2008; Knight & Vollrath, 1999).

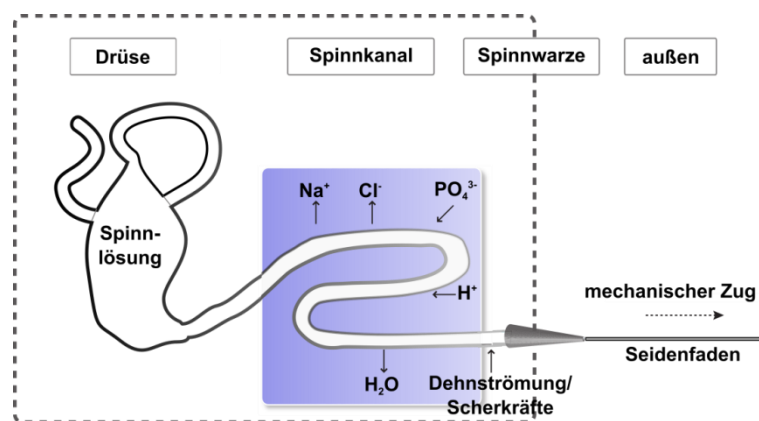


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Spinnprozesses zur Herstellung eines Spinnenseidenfadens (Abseilfadens). Die Spidroine werden in das Lumen der großen Ampullendrüse sezerniert und dort als hochkonzentrierte Spinnlösung gespeichert. Durch verschiedene physiko-chemische Parameter entsteht innerhalb des Spinnkanals bis zum Austritt an der Spinnwarze ein fester Faden. (nach Spiess *et al.*, 2010a, mit Genehmigung des Verlags John Wiley & Sons)

Im Verlauf des Kanals wird durch verschiedene Faktoren eine Phasenseparation induziert, welche schlussendlich zur Bildung eines festen Fadens führt. Ein Faktor ist dabei der kontrollierte Austausch von Natrium- und Chlorid-Ionen gegen kosmotropere Kalium- und Phosphat-Ionen, wodurch hydrophobe Wechselwirkungen verstärkt werden können (Knight & Vollrath, 2001). Einen weiteren Beitrag stellt die Ansäuerung des Milieus mit Hilfe von Protonenpumpen dar, was vermutlich intermolekulare Interaktionen durch Protonierung negativ geladener Aminosäure-Seitenketten erleichtert (Chen *et al.*, 2002; Dicko *et al.*, 2004). Zusätzlich treten durch eine veränderte Geometrie des Spinnkanals (Knight & Vollrath, 1999) Scherkräfte auf, welche die Ausbildung von Protein-Protein-Kontakten und intermolekularen, dicht gepackten β -Faltblatt-Bereichen fördern (Chen *et al.*, 2002; Knight *et al.*, 2000).

Vervollständigt wird der Spinnprozess durch Wasserentzug. Dieser erfolgt aktiv durch Epithelzellen im finalen Teil des Spinnkanals, sowie passiv durch Abstreifen am Ausgang und letztendlich Trocknung des Fadens an Luft (Vollrath & Knight, 2001).

Eine wichtige Rolle bei der gerichteten Assemblierung fällt dabei den nicht-repetitiven Termini zu. Dies wurde vorab vermutet (Ittah *et al.*, 2007), jedoch erst kürzlich anhand verkürzter, rekombinant hergestellter Proteine sowohl für den Amino- als auch für den Carboxyterminus gezeigt (Askarieh *et al.*, 2010; Landreh *et al.*, 2010; Eisoldt *et al.*, 2010; Hagn *et al.*, 2010; Hagn *et al.*, 2011). Die lange repetitive Sequenz der Proteine erschwert deren Sequenzierung, so dass die komplette Sequenz der Aminotermini nur für einige Spinnenarten bekannt ist. Aufgrund der beobachteten hohen Konservierung der bisher bekannten Sequenzen zwischen verschiedenen Spinnen- und Seidenarten ist es jedoch wahrscheinlich, dass sich die Funktionen bei unterschiedlichen Arten entsprechen (Rising *et al.*, 2006).

Einerseits stabilisieren beide Termini die Proteine bei den in der Drüse vorliegenden Bedingungen in Lösung und verhindern so unerwünschte Aggregation. Andererseits ermöglichen sie durch definierte Dimerisierungsoberflächen die gerichtete Anordnung der Proteine (Hagn *et al.*, 2010). Aggregationsanalyse rekombinanter Seidenproteine mit bzw. ohne den Carboxy-Terminus ergab, dass nur bei Anwesenheit des Terminus Fibrillen gebildet werden, während sonst amorphe Aggregate auftraten (Hagn *et al.*, 2010). Beide Termini reagierten zudem sensitiv auf die physiko-chemischen Änderungen während des Spinnprozesses. So wird der Carboxy-Terminus unter Scherkräften und bei sinkender Salzkonzentration (NaCl) destabilisiert (Eisoldt *et al.*, 2010; Hagn *et al.*, 2010). Vermutlich werden dadurch hydrophobe Aminosäureseitenketten exponiert und molekulare Umlagerungen erleichtert, wodurch innerhalb der repetitiven Kerndomäne β -Faltblätter ausgebildet werden können. Zudem führt das Absenken des pH-Wertes (auf den beobachteten Wert von 6,3) zur Dimerisierung der aminoterminalen Domäne, welche bei dem neutralen pH (6,9) im Lumen der Spinndrüse monomer vorliegt (Askarieh *et al.*, 2010; Hagn *et al.*, 2011). Während für den Carboxy-Terminus eine parallele Ausrichtung des Dimers beschrieben wurde (Hagn *et al.*, 2010), erfolgt die Dimerisierung der aminoterminalen Domäne in antiparalleler Ausrichtung (Askarieh *et al.*, 2010). Dies gilt als Voraussetzung zur Ausbildung gerichteter, höher-molekularer Oligomere.

Der Spinnprozess stellt einen entscheidenden Faktor für die Eigenschaften des gebildeten Fadens dar. So variieren die mechanischen Eigenschaften beispielsweise mit der Geschwindigkeit, mit der der Faden gezogen wird (Rousseau *et al.*, 2007). Ein als Rettungsleine im

freien Fall oder bei vertikalem Abstieg gebildeter Faden ist zugfester als ein zum Netzbau verwendeter Faden (Perez-Rigueiro *et al.*, 2005). Auf molekularer Ebene wurden Unterschiede in der Größe und Ausdehnung der vorhandenen kristallinen β -Faltblätter sowie in deren Ausrichtung entlang der Fadenachse beobachtet (Riekel *et al.*, 2000). Zusätzlich beeinflussen passive Parameter, wie die Umgebungstemperatur, Luftfeuchtigkeit oder Ernährung, die Qualität des Fadens (Madsen *et al.*, 1999; Vollrath & Porter, 2006).

Ausreichend hohe Luftfeuchtigkeit oder der Kontakt des Fadens mit Wasser führt zu einer für Seiden typischen Reaktion, der Superkontraktion (Perez-Rigueiro *et al.*, 2003; Shao *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2005). Hierbei kommt es zu einer deutlichen Verkürzung des Fadens, die bei *dragline* Seide am stärksten ausgeprägt ist und bis zu 50 % erreichen kann. Gleichzeitig steigt der Fadendurchmesser. Der zugrundeliegende Mechanismus beruht auf Wechselwirkung der Wassermoleküle mit der intermolekularen Vernetzung der Seidenproteine in den amorphen Bereichen, wodurch deren Vernetzung und Vorspannung gelöst wird und so entropisch getriebene Umlagerungen ermöglicht werden (Ene *et al.*, 2009; Ene *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2005). Dies wurde v. a. auf Prolin-reiche Kettenabschnitte zurückgeführt, da eine direkte Korrelation zwischen Prolin-Gehalt und Superkontraktionsverhalten bei unterschiedlichen Spinnen- und Seidentypen festgestellt wurde (Liu *et al.*, 2008; Savage & Gosline, 2008b; Savage & Gosline, 2008a). Diese Bereiche würden von einem metastabilen, teilweise geordneten Zustand in ungeordnetere Konformationen übergehen. Als weiterer Faktor wurden kürzlich molekulare Relaxationsvorgänge beschrieben, welche durch erhöhten Wassergehalt induziert wurden und einem Glasübergang entsprechen (Guan *et al.*, 2011). Molekulare Grundlage sind hier vermutlich GGX-reiche Motive. Die dicht gepackten β -Faltblatt-Kristalle hingegen werden von den eingetretenen Wassermolekülen weitestgehend nicht beeinflusst (Holland *et al.*, 2008b; Ene *et al.*, 2010; Holland *et al.*, 2004).

1.3 Rekombinante Spinnenseidenproteine

Im Gegensatz zur Seide des Maulbeerspinners *B. mori*, dessen Kokonseide durch Haltung der Raupen auf riesigen Farmen gewonnen wird, gestaltet sich die Gewinnung von Spinnenseiden in großem Maßstab schwierig. Die meisten Spinnen sind aufgrund ihres territorialen und kannibalischen Verhaltens nicht zur Züchtung geeignet (Fox, 1975). Zudem müsste der Faden entweder aus Netzen gesammelt werden, die aber unterschiedlichste Zusammensetzung an Seiden aufweisen, oder durch direktes Melken der Spinnen gewonnen werden, was in großem Maßstab nicht zu realisieren ist.

Daher wurden verschiedene Ansätze entwickelt, um die gewünschten Spinnenseidenproteine rekombinant herzustellen (Vendrelly & Scheibel, 2007; Heim *et al.*, 2009; Rising *et al.*, 2010). Die natürlichen Gene – oder Teile davon – wurden in unterschiedlichen Wirtsorganismen, wie *E. coli*, Tabakpflanzen, Insektenzellen oder Säugetier-Zelllinien exprimiert. Eukaryotische Systeme galten aufgrund der anspruchsvollen Molekülgröße, der repetitiven Zusammensetzung sowie der verwendeten Codons der kodierenden Gene als vielversprechender (Rising *et al.*, 2010). Als dem natürlichen System ähnlichste Variante wurden transgene *B. mori* hergestellt, deren Kokons neben Seidenfibroin auch Spinnenseidenproteine (MaSp1) enthielten (Wen *et al.*, 2010). Eine erfolgreiche Produktion in einem prokaryotischen System (*E. coli*) gelang vor kurzem durch Co-Expression bestimmter tRNAs, welche aufgrund des ungewöhnlich hohen Glycin- und Alanin-Anteils einen limitierenden Faktor darstellen (Xia *et al.*, 2010).

Weitaus mehr Strategien befassen sich jedoch mit der Herstellung neuer, von den bekannten Proteinen abgeleiteter Proteine. Aufgrund des repetitiven Aufbaus aus kurzen, sich wiederholenden Aminosäuremotiven kann dafür ein modularer Ansatz verfolgt werden (Rising *et al.*, 2010; Vendrelly & Scheibel, 2007; Teule *et al.*, 2009). Durch reverse Translation wird das gewünschte Motiv unter Berücksichtigung der *codon usage* des jeweiligen Expressionssystems in eine Oligonukleotidsequenz übersetzt, welche synthetisch hergestellt wird. Durch Kombination unterschiedlicher Sequenzmotive und gezielte Multimerisierung können hierdurch unterschiedliche Gene und somit Proteine generiert werden, die entweder direkt bestimmten Abschnitten der natürlichen Proteine entsprechen oder aber völlig neue Kombinationen enthalten.

Das in dieser Arbeit verwendete Spinnenseidenprotein eADF4(C16) (*engineered* ADF4) wurde mittels solcher Strategie entwickelt und kann in *E. coli* in hoher Ausbeute produziert und anschließend daraus gereinigt werden (Huemmerich *et al.*, 2004a). Es stellt eine rekombinante Variante der repetitiven Konsensussequenz des *dragline* Seidenproteins ADF4 dar. Das 35 Aminosäuren umfassende Konsensusmotiv wurde als Modul C bezeichnet, welches in eADF4(C16) 16-fach wiederholt wird. Somit entspricht es einer verkürzten Variante (Mw 47,7 kDa) von ADF4 ohne nicht-repetitive Termini (Abb. 1.5) (Huemmerich *et al.*, 2004a).

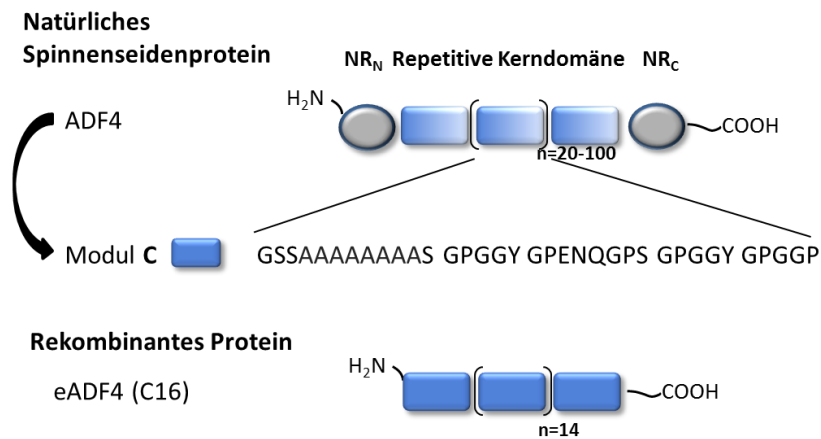


Abb. 1.5: Schematischer Aufbau des rekombinanten Proteins eADF4(C16) (*engineered* ADF4). Aus dem repetitiven Kernbereich des *dragline* Proteins ADF4 der Europäischen Gartenkreuzspinne *A. diadematus* wurde ein Konsensus-Wiederholungsmotiv abgeleitet (Modul C). Durch reverse Translation, Herstellung synthetischer Oligonukleotide und Verwendung einer nahtlosen Klonierungsstrategie wurde daraus das entsprechende Gen für das rekombinante Protein eADF4(C16) generiert (Huemmerich *et al.*, 2004a). Das Protein umfasst 16 C-Module sowie einen aminoterminalen T7-tag und hat ein Molekulargewicht von 47,7 kDa.

1.3.1 Assemblierung des rekombinanten Spinnenseidenproteins eADF4(C16) in verschiedene Morphologien

Wie bereits beschrieben, basiert die Fadenassemblierung natürlicher Spinnenseidenproteine auf einer Phasenseparation und einem flüssig-fest Phasenübergang, was während des Spinnprozesses durch verschiedene physiko-chemische Parameter induziert wird. Analog dazu kann das rekombinante Protein eADF4(C16) aus Lösung in feste, makromolekulare Anordnungen assemblieren (Abb. 1.6) (Hardy *et al.*, 2008). Die Morphologie, d. h. Form und strukturelle Beschaffenheit, variiert dabei mit den gewählten Parametern. Kritisch sind u. a. die Ausgangs-Proteinkonzentration, das Lösungsmittel sowie evtl. ein die Phasenseparation induzierendes Additiv bzw. Fällungsmittel (z. B. Phosphat oder Methanol) (Hardy *et al.*, 2008; Spiess *et al.*, 2010a).

Über verschiedene aus der Polymerchemie bekannte Spinnverfahren (wie Nass- oder Elektrospinnen) kann eADF4(C16) in Fasern überführt werden. Auch mittels eines biomimetischen Ansatzes, welcher auf den im natürlichen Prozess auftretenden Parametern basiert, können fibrilläre Strukturen generiert werden (Keerl *et al.*, 2010; Rammensee *et al.*, 2008). Dispersionsysteme aus unterschiedlich polaren Lösungsmitteln hingegen können benutzt werden, um dünnwandige Kapseln aus dem Protein zu generieren (Hermanson *et al.*, 2007b; Lieb *et al.*, 2005). Hierbei kommt es an der Phasengrenze zur spontanen Ausbildung eines β -Faltblattreichen, intermolekularen Netzwerkes. Partikel entstehen durch Aussalzen von eADF4(C16) aus wässriger Lösung, beispielsweise mit Kaliumphosphat (Slota *et al.*, 2008; Lammel *et al.*, 2008). Die Proteinkonzentration sowie die Mischparameter entscheiden dabei über die Größe und Polydispersität der gebildeten Kugeln (Lammel *et al.*, 2008). Ohne Zusatz von Additiven

erfolgt in Lösung bei ausreichend hoher Ausgangsproteinkonzentration zeitabhängig eine Selbstassemblierung von eADF4(C16) zu Fibrillen von einigen Mikrometern Länge (Slotta et al., 2007; Slotta et al., 2008). Die Kinetik der Assemblierung kann über verschiedene Parameter (wie Salz, Temperatur oder pH) kontrolliert werden (Slotta et al., 2008). Wird dabei durch eine hohe Ausgangsproteinkonzentration ein Netzwerk aus Fibrillen gebildet, so kann darin Wasser eingeschlossen werden. Die daraus resultierenden Hydrogele lassen sich durch Wahl der Ausgangsparameter oder zusätzlicher Quervernetzung der Moleküle in ihren rheologischen und mechanischen Eigenschaften sowie in ihrer mikroskopischen Struktur beeinflussen (Schacht & Scheibel, 2011). Proteinfilme entstehen durch Verteilung einer Proteidlösung (meist durch Gießen, Rotationsbeschichtung (*spin coating*), Sprühbeschichtung (*spray coating*) oder Rakeln) und anschließendem Abdampfen des Lösungsmittels (Huemmerich et al., 2006; Metwalli et al., 2007; Spiess et al., 2010a; Slotta et al., 2006).

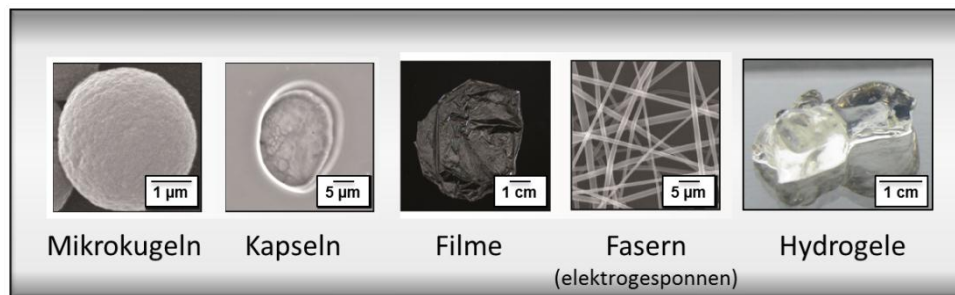


Abb. 1.6: Verschiedene Morphologien, gebildet aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16). Durch unterschiedliche Prozessierung lassen sich Mikrokugeln oder Kapseln sowie Filme, Vliese/Fasermatten oder Hydrogele herstellen (verändert nach Spiess *et al.*, 2010a, mit Genehmigung des Verlags John Wiley & Sons; Foto Hydrogel: freundlicherweise von Kristin Schacht zur Verfügung gestellt).

1.3.2 Seidenfilme

Für Filme aus Seidenproteinen wurden bereits vielfältige Anwendungsbereiche beschrieben. Die meisten Arbeiten konzentrieren sich dabei auf das seit längerer Zeit in großen Mengen verfügbare Seidenfibroin aus *B. mori*, welches hierfür regeneriert, d. h. nach Auflösen des Fadens neu verarbeitet, wird (Altman et al., 2003; Vepari, 2007; Murphy & Kaplan, 2009). Im Fokus stehen dabei v. a. biomedizinische Anwendungen (s. Tabelle 1.3). Hier werden Seidenfilme z. B. als biokompatible Trägersysteme für kontrollierten Wirkstofftransport und -freisetzung oder als Wundabdeckung eingesetzt. Viele Untersuchungen konzentrieren sich zudem auf den Bereich des Tissue Engineering, besonders zur Regeneration von Knochen, Knorpel sowie der Kornea (s. Tabelle 1.3). Hierfür erwies sich eine Funktionalisierung der Filme mit zusätzlichen Co-Faktoren (wie RGD oder BMP-2) oder Bio-mineralisierung mit z. B. Hydroxyapatit als vorteilhaft. Weitere Anwendungen sind biokompatible Beschichtungen von z. B. Implantaten, um die Adhäsion von Zellen entweder

zu fördern oder zu minimieren. Kürzlich wurden Implantate mit elektronischer Steuerung zur Anwendung im Gehirn vorgestellt, wobei SF-Filme als Trägersystem fungieren (Tabelle 1.4).

Tabelle 1.3: Biomedizinische Anwendungsfelder von Filmen aus Seidenfibroin (SF) von *B. mori*.

Molekül	Funktionalisierung	Anwendung (getesteter Zelltyp)	Referenz
SF (regen.)	/	Drug delivery/ Wirkstoff-Trägersysteme	(Wang <i>et al.</i> , 2007a; Hines & Kaplan, 2011; Hofmann <i>et al.</i> , 2006; Wang <i>et al.</i> , 2007b; Wenk <i>et al.</i> , 2009)
SF (regen.)	/	Wundabdeckung/Hautersatz (L929 Fibroblasten)	(Liu <i>et al.</i> , 2010; Sugihara <i>et al.</i> , 2000; Cassinelli <i>et al.</i> , 2006)
SF (regen.)	Sulfonsäure Hyaluronsäure	Tissue Engineering/ artifizielle ECM	(Wenk <i>et al.</i> , 2010) (Garcia-Fuentes <i>et al.</i> , 2009)
SF (regen.)	Caliciumsilikat	Tissue Engineering (Knochen), (MG63)	(Zhu <i>et al.</i> , 2011)
SF (regen.)	Silica-Partikel	Tissue Engineering (Knochen), (hMSC)	(Mieszawska <i>et al.</i> , 2010a)
SF (regen.)	RGD BMP-2	Tissue Engineering (Knochen), (BMSCs, Saos-2)	(Sofia <i>et al.</i> , 2001; Chen <i>et al.</i> , 2003) (Karageorgiou <i>et al.</i> , 2004)
SF (regen.)	- /RGD	Tissue Engineering (v.a. Kornea)	(Gil <i>et al.</i> , 2010a; Gil <i>et al.</i> , 2010b; Lawrence <i>et al.</i> , 2009)
SF (regen.)	IGF-1	Knorpelregeneration, Biosensorik	(Uebersax <i>et al.</i> , 2008)
SF (regen.)	PEG	Antiadhäsiv, Antikoagulation (Fibroblasten)	(Vepari, 2009)
SF (rekombinant)	Kollagen/Fibronectin	Zelladhäsion (BMSC, HepG2)	(Yanagisawa <i>et al.</i> , 2007; Lv <i>et al.</i> , 2008)
SF (regen.)	Keratin Polylaktonsäure (PLA)	Zelladhäsion (L929-Fibroblasten)	(Vasconcelos <i>et al.</i> , 2008) (Zhu <i>et al.</i> , 2009)
SF (regen.)	Adenosin	Wirkstoffträger, Implantate (Gehirn)	(Uebersax <i>et al.</i> , 2006; Wilz <i>et al.</i> , 2008; Szybala <i>et al.</i> , 2009; Pritchard <i>et al.</i> , 2011)
SF (regen.)	Ultradünne Filme (480 nm)	biokompatible Implantate, Hautersatz	(Jiang <i>et al.</i> , 2007)

regen.: regeneriert, RGD: Zelladhäsionssequenz (Arg-Gly-Asp), BMP-2: *bone morphogenetic protein 2*, PEG: Polyetylen glycol, IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*, hMSC: *human mesenchymal stem cells*, BMSC: *bone marrow stromal cells*

Die Kombination von Seidenfilmen mit darin eingeschlossenen bzw. immobilisierten oder komplexierten Enzymen oder Metallionen kann dazu genutzt werden, biochemische Sensoren oder spezifische Katalysatoren (z. B. durch Komplexierung von Palladium) zu erzeugen. Durch Prägung/Strukturierung der Filme im Nanometer-Bereich konnten zudem neue magnetische, elektronische und optische Eigenschaften generiert werden, was Anwendungen im Bereich der Photonik und Biosensorik eröffnet. Eine Übersicht gibt Tabelle 1.4.

Tabelle 1.4: Übersicht über Anwendungen von Seidenfibroin-Filmen mit neuen elektronischen, magnetischen oder optischen Eigenschaften sowie als Biosensoren.

Molekül	Beschreibung	Anwendungsfelder	Referenz
SF (regen.)	mittels Abformung erzeugt	Mikrofluidik-Einheiten	(Bettinger <i>et al.</i> , 2007)
SF (regen.)	Einschluss und Stabilisierung von Glukose-Oxidase bzw. HRP	Biosensorik	(Lu <i>et al.</i> , 2009; Hofmann <i>et al.</i> , 2006)
SF	Komplexierung von Palladium als Katalysator	Katalysatoren	(Ikawa <i>et al.</i> , 2005; Sajiki <i>et al.</i> , 2003a; Sajiki <i>et al.</i> , 2003b)
SF-Film	Film als biokompatibler Träger für Transistoren/Steuerlektronik	elektronische Implantate	(Kim <i>et al.</i> , 2009; Kim <i>et al.</i> , 2010)
SF-Film	Film als Trägermembran in Brennstoffzelle	Brennstoffzellen	(Liu <i>et al.</i> , 2012)
SF (regen.)	(nano)lithographisch geprägt	Biophotonik: (biokompatible) Wellenleiter/optische Hohlleiter (Sensoren, Bildgebung, mikroelektromechanische Systeme)	(Amsden <i>et al.</i> , 2010; Parker <i>et al.</i> , 2009) (Mondia <i>et al.</i> , 2010)
SF (regen.)	Blend mit GFP (Zwei-Photonen-Absorption)	Photonik	(Putthanarat <i>et al.</i> , 2004)
SF (regen.)	(nano) Strukturiert (Lithographie)	Biosensorik (optische Aktivität)	(Amsden <i>et al.</i> , 2009; Domachuk <i>et al.</i> , 2009; Lawrence <i>et al.</i> , 2008)
SF (regen.)	Strukturiert (Lithographie - Lochmaske)	Metamaterialien Biosensoren (<i>in vivo</i>)	(Tao <i>et al.</i> , 2010; Tao <i>et al.</i> , 2011)
SF (regen.)	Strukturiert (Lithographie - Lochmaske)	Biosensorik (Nahrungsmittel)	(Tao <i>et al.</i> , 2012)

Auch rekombinant hergestellte Spinnenseidenproteine, darunter beispielsweise eADF4(C16), können zu transparenten Filmen verarbeitet werden (Kluge *et al.*, 2008; Slotta *et al.*, 2006; Huemmerich *et al.*, 2006). Von dem von *B. mori* produzierten Seidenfibroin unterscheiden sich diese Proteine trotz ähnlicher Primärsequenz und hierarchischem Aufbau z. B. in ihren mechanischen Eigenschaften. Zudem ermöglicht die rekombinante Produktion die Herstellung monodisperser Proteine in reproduzierbarer Qualität, während natürliches Material Qualitätsschwankungen unterworfen ist (Ramsden, 2008), sowie vielfältigere Optionen der Funktionalisierung oder Kombination gewünschter Eigenschaften. Bisher veröffentlichte Arbeiten konzentrieren sich auf grundlegende Untersuchung der Biokompatibilität der jeweiligen Filme und Nutzung der Filme als nicht-virale Genvektoren (Tabelle 1.5).

Tabelle 1.5: Übersicht über Anwendungen bzw. Interaktionen von Filmen aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen.

Molekül	Funktionalisierung	Anwendung (getesteter Zelltyp)	Referenz
4RepCT (<i>E. australis</i> MaSp1)	-	Fibroblasten (human)	(Widhe <i>et al.</i> , 2010)
<i>N. clavipes</i> MaSp1	Elastin-like Peptid	Chondrozyten (Knorpel)	(Scheller <i>et al.</i> , 2004)
15 mer (<i>N. clavipes</i> MaSp1)	RGD	hMSCs, MC3T3-E1	(Bini <i>et al.</i> , 2006; Morgan <i>et al.</i> , 2008)
15 mer (<i>N. clavipes</i> MaSp1)	R5 [#] /RGD	Biominalisation/Knochenregeneration (hMSC)	(Mieszkowska <i>et al.</i> , 2010b; Foo <i>et al.</i> , 2006)
pNSR16, pNSR32	RGD	Wundabdeckung (<i>in vivo</i> , Ratte)	(Baoyong <i>et al.</i> , 2010)
Block-Copolymer (<i>N. clavipes</i> MaSp1)		Beschichtungen	(Krishnaji <i>et al.</i> , 2011)
Block aus <i>N. clavipes</i> MaSp1	Polylysin	Gentherapie (nicht-virale Genvektoren)	(Numata <i>et al.</i> , 2009)

RGD: Zelladhäsionssequenz (Arg-Gly-Asp), [#]R5-Peptid Silaffin, hMSC: *human mesenchymal stem cells*

Filme aus eADF4(C16) wurden bereits aus Lösung in Hexafluoroisopropanol gegossen (Slotta *et al.*, 2006; Junghans, 2006; Metwalli *et al.*, 2007; Huemmerich *et al.*, 2006). Diese Filme wurden hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur analysiert, wobei sich zeigte, dass Filme mit einer von α -Helices dominierten Struktur nach Inkubation mit Methanol oder Kaliumphosphat eine β -Faltblatt-reiche Struktur aufweisen. Röntgenbeugungs- und SAXS-Analysen lieferten Hinweise auf kristalline Bereiche mit einer Ausdehnung zwischen 2-40 nm, wobei der Großteil bei etwa 7-8 nm lag (Metwalli *et al.*, 2007). Dies wurde analog zu dem Seidenfaden hochgeordneten β -Faltblatt-Bereichen zugeordnet.

1.4 Zielsetzung

Seidenproteine stellen aufgrund ihrer Eigenschaften einen vielversprechenden Ausgangswerkstoff für verschiedenste Materialien und Anwendungsbereiche dar. Durch rekombinante Herstellungstechniken sind von Spinnenseiden abgeleitete Proteine in ausreichenden Mengen verfügbar und können in diverse Morphologien assembliert werden.

In dieser Arbeit sollten Filme aus eADF4(C16), welches ein rekombinant produziertes Protein auf Basis der repetitiven Kerndomäne des *dragline* Seidenproteins ADF4 darstellt, umfassend charakterisiert werden. Im Mittelpunkt stand dabei eine systematische Analyse des Einflusses verschiedener Parameter bei der Filmherstellung. Die dabei variierten Parameter umfassten das gewählte Lösungsmittel, verschiedene chemische und physikalische Nachbehandlungsmethoden sowie Umgebungsparameter. Die resultierenden Filme sollten dabei hinsichtlich materialanalytischer Aspekte untersucht werden. Hierzu gehören die mechanischen Eigenschaften der Filme und ihre thermische und chemische Beständigkeit. Ein weiteres Augenmerk sollte auf der Charakterisierung der Filmoberfläche im Hinblick auf deren Topographie sowie Benetzbarkeit liegen. Zum Verständnis zugrundeliegender molekularer Vorgänge/Voraussetzungen wurde die Sekundärstruktur der Proteine in den jeweiligen Filmen detailliert analysiert.

Ein Vorteil Protein-basierter Materialien liegt in ihrer Modifizierbarkeit bzw. Funktionalisierbarkeit mit weiteren Molekülen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte dafür die Möglichkeit der post-translationalen, chemischen Kopplung mit diversen Molekülen genutzt werden. Um eine einfache, spezifische und kontrollierte Kopplung zu ermöglichen, wurde hierfür ein Cystein in die Sequenz von eADF4(C16) integriert. Es wurden drei verschiedene Proteinvarianten hergestellt, welche hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften, wie Sekundärstruktur und Dimerisierungsverhalten, ihrer Assemblierung und Modifizierbarkeit mit Modell-Molekülen untersucht werden sollten.

Schließlich sollte die potentielle Eignung von eADF4(C16)-Filmen für verschiedene Applikationsfelder geprüft werden. Zum einen wurde die Beschichtung unterschiedlicher (technischer) Substrate und daraus resultierende Oberflächeneigenschaften getestet, zum anderen sollte die Interaktion mit biologischem Material, speziell die biologische Verträglichkeit des Materials und sein Potential für die Kultivierung von Säugetierzellen, untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Oligonukleotide, Peptide und Linker

2.1.1.1 Oligonukleotide

In dieser Arbeit wurden synthetische Oligonukleotide (hergestellt von MWG-Biotech AG, Ebersberg) verwendet, die sowohl als Matrizen zum Assemblieren eines DNA-Doppelstrangs (ntag^{Cys} -fwd, ntag^{Cys} -rev) als auch in der Polymerasekettenreaktion (pCSmut-fwd, pCS-C^{S25C}-rev) eingesetzt wurden. Für die Sequenzierung wurden Standardprimer eingesetzt (GATC, Konstanz).

Oligonukleotid	Basensequenz (5'→3')	Bemerkung
ntag^{Cys} -fwd	GATC CATG GGT TGC GGT GGC TCT GGT GGT GGC GGG TCC GGA GGC GGT GGC TAA TGA A	codiert für AS-Sequenz MGCGGSGGGGSGGGG (ntag^{Cys}):
ntag^{Cys} -rev	AGCTT TCA TTA GCC ACC GCC TCC GGA CCC GCC ACC ACC AGA GCC ACC GCA ACC CATG	
pCSmut-fwd	CACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGA	erzeugt Modul C* (mit S25C)
pCS-C ^{S25C} -rev	CTCTTAAGCTTTCATTAGCCTGGACCACCTGGACCG TAGCCGCCCCGGGCCGCAAGGACCCTGG	

2.1.1.2 Peptide und Linker

Name	Beschreibung	Quelle
c(RGDfK) (s. Abb. 3.23)	Die Aminosäurereste sind durch den Einbuchstabencode dargestellt, wobei Großbuchstaben L- und Kleinbuchstaben D-Aminosäuren kennzeichnen (Kantlehner, Schaffner et al., 2000). Zusätzlich wurde über den Linker SMCC eine Maleimid-Funktionalität angebracht. Zur Detektion wurde zusätzlich Fluorescein angefügt.	AG Prof. Kessler, TU München (Dr. Monica Lopez)
SMCC	Succinimidyl trans-4-(maleimidylmethyl)cyclohexan-1-carboxylat	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
NHS-PEO₁₂-Maleimide	Heterobiunktioneller Crosslinker, Spacer-Länge: 5,34 nm	Pierce, IL, USA

2.1.2 Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Vektor pAZL in Kombination mit dem von D. Hümmelich etablierten Klonierungssystem verwendet (Hümmelich *et al.*, 2004a). Als Ausgangsvektor wurde dabei pAZL-C eingesetzt, welcher bereits die für ein C-Modul kodierende Gensequenz enthält. Zur Genexpression wurden die Vektoren pET21a sowie pET29a verwendet, je nach gewünschter Resistenz gegenüber Ampicillin (AmpR) bzw.

Kanamycin (Kan^R). Eine Subklonierung in pET29a erfolgte ausgehend von pET21a, so dass alle in dieser Arbeit erzeugten Konstrukte einen aminoterminalen T7-tag trugen.

pAZL-C	pFastbac1 mit zusätzlicher Klonierungskassette und einem C-Modul	(Huemmerich <i>et al.</i> , 2004a)
pET21a	Amp ^R , T7, His-Tag (N), T7-Tag (N), fl ori, <i>lacI</i>	Novagen, Madison, WI, USA
pET29a	Kan ^R , T7, His-Tag (C), S-Tag (N), fl ori, <i>lacI</i>	Novagen, Madison, WI, USA

2.1.3 Organismen

2.1.3.1 Bakterien

Zur Klonierung und Vermehrung von Plasmid-DNA wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* DH10B verwendet, zur Proteinproduktion der Stamm HMS174(DE3).

<i>E. coli</i> DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> Δ (<i>araleu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL nupG</i> λ - <i>tonA</i>	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>E. coli</i> HMS174(DE3)	F ⁻ <i>recA1 hsdR</i> (r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) (DE3) (Rif ^R)	Novagen, Madison, WI, USA

2.1.3.2 eukaryotische Zelllinie

MC3T3-E1 (DSMZ: ACC 210)	Murine fibroblastenartige Zellen (aus der Calvaria einer C57BL/6 Maus (Embryo))	Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Deutschland
-----------------------------	---	--

2.1.4 Enzyme und Antikörper

Restriktionsenzyme	NEB, Frankfurt a. M., Deutschland
T4 DNA Ligase	Promega, Madison, WI, USA
Lysozym	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
SAM (S-Adenosylmethionin)	NEB, Frankfurt a. M., Deutschland
Humanes Serum Albumin (HSA)	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
<i>shrimp alkaline phosphatase</i> , SAP	Roche, Mannheim, Deutschland
α -T7-tag Antikörper (monoklonal, Maus)	Novagen, Madison, WI, USA
α -Maus-IgG-HRP (<i>horseradish peroxidase</i>) Konjugat (Ziege)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Streptavidin-AP (Alkalische Phosphatase) Konjugat	Sigma, St. Louis, MO, USA

2.1.5 Größenstandards und Kits

Precision Plus Protein Standards Dual Color	BioRad, München, Deutschland
ColorPlus Prestained Protein Marker (7-175 kDa)	NEB, Frankfurt a. M., Deutschland
DNA-Längenstandard (1 kb Ladder)	NEB, Frankfurt a. M., Deutschland
DNA-Längenstandard (100 bp Ladder)	NEB, Frankfurt a. M., Deutschland

Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System
 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System
 ECL-Western Blot Detektionssystem

Promega, Madison, WI, USA
 Promega, Madison, WI, USA
 Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA

2.1.6 Chemikalien und Biochemikalien

Substanz

1,1,1,3,3,3 Hexafluor-2-Propanol (HFIP)
 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol (TRIS)
 2-Mercaptoethanol
 Acrylamidlösung Rothiphorese Gel 40
 Ammoniumperoxodisulfat (APS), p. a
 Ampicillin Natriumsalz, >99 %
 Brilliant Blau G 250
 di-Kaliumhydrogenphosphat
 Dulbecco's Modified Eagle Medium
 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
 Einfriermedium
 Ethanol
 Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
 Fötale Kälberserum
 Fluorescein 5-Maleimid

 Formaldehyd, 37 %, p. a.
 Glycin
 Glycerin
 Goldenhance™-EM
 Guanidiniumthiocyanat
 HCl
 Humanes Serum Albumin (HSA)
 Kanamycinsulfat
 Kaliumdihydrogenphosphat
 L-Lysin
 Maleimid PEO₂-Biotin

 Methanol
 Monomaleimido Nanogold
 N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2- ethansulfonsäure (HEPES)
 N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED)
 Natriumchlorid
 Natriumdodecylsulfat (SDS), > 85 %
 Penicillin (10000 U/ml) /Streptomycin (10 mg/ml)–Lösung
 Trifluoressigsäure (TFA)
 Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochlorid (TCEP-HCl)
 Trypsin-EDTA (0,05 %)
 Tween 20, molecular biology grade
 WST-1 (water soluble tetrazonium)

Firma

Merck, Darmstadt, Deutschland
 Roth, Karlsruhe, Deutschland
 Merck, Darmstadt, Deutschland
 Roth, Karlsruhe, Deutschland
 Roth, Karlsruhe, Deutschland
 Roth, Karlsruhe, Deutschland
 Roth, Karlsruhe, Deutschland
 Biochrom, Berlin, Deutschland
 Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Gibco/Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
 VWR, Darmstadt, Deutschland
 Merck, Darmstadt, Deutschland
 Biochrom, Berlin, Deutschland
 Pierce/Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
 Roth, Karlsruhe, Deutschland
 Roth, Karlsruhe, Deutschland
 Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Nanoprobe, Yaphank, NY, USA
 Merck, Darmstadt, Deutschland
 Roth, Karlsruhe, Deutschland
 Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Roth, Karlsruhe, Deutschland
 Roth, Karlsruhe, Deutschland
 Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Pierce/Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
 Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Nanoprobe, Yaphank, NY, USA
 Roth, Karlsruhe, Deutschland
 Roth, Karlsruhe, Deutschland
 Merck, Darmstadt, Deutschland
 Merck, Darmstadt, Deutschland
 Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Roth, Karlsruhe, Deutschland
 Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
 Merck, Darmstadt, Deutschland
 Roche, Mannheim, Deutschland

Weitere verwendete Chemikalien stammen, falls nicht anders vermerkt, von der Firma Merck in Darmstadt oder Firma Roth in Karlsruhe und hatten den Reinheitsgrad p.a.. Alle Lösungen und Puffer wurden mit ultrareinem Wasser aus einer Milli-Q-Anlage von Millipore (Billerica, MA, USA), hergestellt.

2.1.7 Sonstige Materialien/Verbrauchsmaterialien

Aluminiumoxid-Tiegelchen für TGA	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Aluminiumtiegel für DSC	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Lo Laboroptik, Friedrichsdorf, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Multiwell-Platten (96-well, 24-well) - Nunclon™	Nunc, Roskilde, Dänemark
Multiwell-Platten (96-well, 24-well) – für Suspensionszellen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen	Corning Lifesciences, NY, USA
Quarzglas Suprasil Küvetten (unterschiedliche Ausführungen)	Hellma, Mühlheim, Deutschland
Gelfiltrationssäule Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, München, Deutschland
Membranfilter (0,22 µm und 0,45 µm)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Membranfilter (0,1 µm)	Millipore, Billerica, MA, USA
Micro Cantilever OMCL – AC 160 TS-W2	Olympus, Tokyo, Japan
Leitsilber	Plano, Wetzlar, Deutschland
Plastik Modellbaukleber	UHU GmbH & Co. KG, Bühl, Deutschland
REM-Probenhalter	Agar Scientific Ltd., Essex, UK
TEM-Netzchen (grids, vergoldet, 400 mesh)	Plano, Wetzlar, Deutschland
Thermanox® plastic cover slips	Nalge Nunc Int., Rochester, NY, USA
SERVAGel™ TG 4-20	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

2.1.8 Geräte und technische Hilfsmittel

Gerät	Modell	Firma
Absorptionsspektrophotometer	Cary 50 Bio	Varian, Darmstadt, Deutschland
Blotapparatur	Fastblot B44	Biometra, Göttingen, Deutschland
Brechungsindexdetektor	RI-71	Shodex, Tokyo, Japan
Brutschrank	Heracell 150i	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
	WB 560 K	mytron Bio- und Solartechnik GmbH, Heilbad Heiligenstadt, Deutschland
CD-Spektrometer	J-715	Jasco, Tokyo, Japan
Dynamisch mechanische Analyse	TA DMA 2980	TA Instruments, Newcastle, DE, USA
Fed-Batch Reaktor	Minifors	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
Fluoreszenz-Imager	Ettan DIGE	GE Healthcare, München, Deutschland
Fluoreszenzspektrometer	FP-6500	Jasco, Essex, UK
FTIR-Spektrometer	FTS6000	Varian, Darmstadt, Deutschland
	Detektor: <i>MCT</i>	
	Mikroskop: <i>UMA 500</i>	
	Filter: <i>ZnSe-Polarisationsfilter (motorbetrieben)</i>	
	Klimakammer: <i>ZnSe-Fenster, Temperatur und RF-Kontrolle</i>	
	Kraftsensor: <i>Burster 8411-10</i>	Burster, Gernsbach, Deutschland

FTIR-Spektrometer	Tensor 27 IR-Spektrometer Detektor: <i>MCT</i> Messeinheit: <i>MIRacle</i> <i>Germanium-ATR-Kristall</i>	Bruker, Rheinstetten, Deutschland
Geldokumentation	GelDoc XR-System	BioRad, München, Deutschland
Hochdruckhomogenisator	M-110S	Niro Soavi, Lübeck, Deutschland
HPLC System	Series 1100 (Pumpe, Entgaser, UV-Detektor, Probengeber, Temperiereinheit)	Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA
HPLC System	PU 2080Plus UV 2075Plus FP 2020Plus	Jasco, Tokyo, Japan
Kalorimeter (DSC)	SDTA 821e System	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Klimakammer	Eigenbau (Gregor Lang) Luftbefeuchter <i>Modell 5462</i>	Universität Bayreuth, Deutschland ets®, Glenside, PA, USA
Konfokales Laser-Scanning- Mikroskop	LSM 710	Zeiss, Jena, Deutschland
Kontaktwinkelmessung	OCA System	Dataphysics Instruments GmbH, Filderstadt Deutschland
Lichtmikroskop	DMIL LED mit DFC 295 Farb- kamera	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Lichtstreuendetektor	DAWN EOS (statische LS) QELS (dynamische LS)	Wyatt Technology Europe, Dernbach, Deutschland
Lyophylle	Alpha 1-2 LD plus	Christ, Osterode, Deutschland
Massenspektrometer	Bruker Reflex III	Bruker, Bremen, Deutschland
Ofen	Heraeus Function Line UT 20	Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA
pH Meter	Lab 860	Schott AG, Mainz, Deutschland
Platereader	Mithras LB 940	Berthold Technologies, Spremlingen, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop	1540EsB Cross Beam	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Rasterkraftmikroskop	DimensionTM 3100 ausgestattet mit Nanoscope IV SPM Controller	Veeco Instruments Inc., Plainview, NY, USA
Sterilwerkbank	HERAsafe KS	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Thermocycler	Primus	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Thermogravimeter (TGA)	SDTA 861e	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Thermomixer	Thermo Compact/comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transmissionselektronen- mikroskop	100 CX	Jeol, Tokyo, Japan
Überkopfschüttler		Heidolph, Schwabach, Deutschland
Ultrazentrifuge	Optima MAX-XP Rotor: <i>TLA-55</i>	Beckmann Coulter Inc., Brea, CA, USA
Waagen	CPA 225D (Feinwaage) Acculab ALC-3100.2 Acculab ALC-4100.1	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifugen	Heraeus primo R Heraeus Fresco 17 Heraeus Pico 17 Sorvall RC 6 plus Optima MAX-XP	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA Beckman-Coulter, Brea, CA, USA
Zugmaschine	Universal Tester 5565	Instron, Norwood, MA, USA

2.1.9 Computerprogramme

Astra 5.3.4.14	Wyatt Technology Europe, Dernbach, Deutschland
ExPASy - SIB Bioinformatics Resource Portal	http://expasy.org/
GENTle	Magnus Manske, Köln, Deutschland
Nanoscope 6.14r1	Veeco Instruments Inc. N.Y., USA
Opus 6.5	Bruker Optics Corp., Billerica, MA, USA
OriginPro 8.1G	OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA
Swiss-PdB-Viewer Deep View v 4.0.4	Swiss institute of bioinformatics, http://www.expasy.org/spdbv , (Guex & Peitsch, 1997)
Advantage Universal Analysis v5.4	TA Instruments, Newcastle, DE, USA
Vector NTI Advance 10	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Anzucht von *Eschericia coli*

Ausstrichkulturen von *E. coli* auf LB-Agarplatten wurden über Nacht (ÜN) bei 37 °C oder 2-3 Tage bei RT inkubiert. Zum Animpfen von Flüssigkulturen wurden Einzelkolonien verwendet, bei Volumina größer als 50 ml dienten entsprechende Vorkulturen zur Inokulation. Sowohl den Agarplatten als auch dem Flüssigmedium wurden entsprechende Antibiotika zur Selektion des jeweiligen Plasmids zugesetzt. Volumina bis zu 4 ml wurden im Reagenzglasroller inkubiert, Kulturen über 10 ml im Umluftschüttelinkubator. Das Wachstum der Bakterien wurde photometrisch über die optische Dichte der Kultur bei 600 nm (OD_{600}) verfolgt. Nach (Sambrook & Russell, 2001) ergeben etwa 8×10^8 Zellen pro ml eine OD_{600} von 1.

Zur langfristigen Lagerung von Bakterienstämmen wurden 700 µl einer sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Bakterienkultur mit 300 µl Glycerin (50 %) versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

LB ₀ -Medium:	10 g/l	Bacto Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl
für LB ₀ -Platten: Zugabe von 15 g/l Bacto-Agar		
Antibiotikum:	100 µg/ml	Ampicillin (Amp)
	35 µg/ml	Kanamycin (Kana)

2.2.2 Präparation, Reinigung und Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde der *Wizard Plus SV Miniprep Kit* laut Herstellerangaben verwendet, welcher auf dem Prinzip der alkalischen Lyse und selektiver Adsorption von DNA verschiedener Größe beruht. Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen sowie die Reinigung von PCR-Amplifikaten erfolgte mittels *Wizard SV Gel and PCR clean-up System* nach Angaben des Herstellers.

Die Sequenzierung der erhaltenen Plasmide wurde durch die Firma GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Wenn möglich, wurden dazu Standardprimer von GATC Biotech verwendet, sonst wurden entsprechende Primer bereitgestellt.

2.2.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Zur Transformation wurden 50-100 µl chemisch kompetenter Zellen (nach Maniatis *et al.*, 1982) mit 1 µl Plasmid-DNA bzw. 20 µl Ligationsansatz vermischt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis folgte ein einminütiger Hitzeschritt bei 42 °C. Anschließend wurde der Ansatz kurz auf Eis abgekühlt, mit 200-500 µl LB₀ versetzt, und 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension auf entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen und ÜN bei 37 °C kultiviert.

Die Transformation erfolgte dabei für die Vervielfältigung von Plasmid-DNA in den Klonierungsstamm DH10B bzw. zur Expression in HMS174(DE3).

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse bzw. anschließender Präparation wurden DNA-Proben einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen. Die Auftrennung verschiedener Fragmente erfolgt dabei in Abhängigkeit der Länge des Fragments, der Form der DNA, der Porengröße des Gels, sowie der angelegten Spannung. Ein gleichzeitig aufgetragener DNA-Größenstandard, bestehend aus doppelsträngigen linearen DNA-Fragmenten definierter Länge, ermöglicht die Abschätzung der Größe der untersuchten Probe.

Zur Herstellung 1-2 %-iger (w/v) Agarosegele wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Vor dem Gießen des Gels wurde der auf etwa 60 °C abgekühlten Agaroselösung 0,04 % (v/v) Ethidiumbromid bzw. 0,01 % (v/v) SybrSafe zugesetzt. Beide Agenzien ermöglichen eine Detektion der aufgetrennten DNA-Banden mittels Anregung mit UV-Licht (Anregung: 302 nm, Emmission: > 500 nm).

Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag mit 10x Auftragspuffer versetzt, die Auftrennung erfolgte bei 120 V für 30-45 min. Für präparative Ansätze erfolgte eine anschließende Reinigung des DNA-Fragments mittels *Wizard SV Gel and PCR clean-up System* (s. 2.2.2)

50 x TAE:	2 M	Tris/Acetat, pH 8,0
	50 mM	EDTA
10 x Auftragspuffer:	50 % (v/v)	Glycerin
	10 mM	EDTA
	0,2 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,2 % (w/v)	Xylencyanol

2.2.5 Hybridisierung synthetischer Oligonukleotide

Um kurze, doppelsträngige DNA-Fragmente zu erhalten, wurden zwei komplementäre, synthetisch hergestellte Oligonukleotide hybridisiert. Eine Lösung mit 50 pmol/μl je Oligonukleotid in 10 mM Tris pH 8,5 wurde 5 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde mit einer Rate von 0,1 °C/s auf 20 °C abgekühlt. Zur Optimierung der Hybridisierung wurden eventuell fehlgepaarte Doppelstränge für 1 min bei 70 °C denaturiert. Die Lösung wurde wie oben beschrieben abgekühlt. Dieser Zyklus erfolgte je zehnmal bei einer Temperatur von 70 °C, 65 °C sowie 60 °C.

2.2.6 Amplifikation von DNA mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ermöglicht die Amplifikation einer doppelsträngigen DNA-Matrize durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Ein zugegebenes spezifisches Primerpaar definiert dabei den zu amplifizierenden Abschnitt und stellt mit den 3'OH-Enden die Startpunkte für die Anheftung der Desoxynukleotide dar. In dieser Arbeit wurde durch Verwendung des Primerpaares pCS-C^{S25C}-rev (63 Basen) und pCSmut-fwd (28 Basen) die Mutation S25C in der für das Modul C kodierenden Sequenz erzeugt. Als Matrize diente das Plasmid pAZL-C, welches die für ein C-Modul kodierende DNA-Sequenz trägt. Um die Ausbildung stabiler Sekundärstrukturen des langen Primers pCS-C^{S25C}-rev zu minimieren, wurden zudem einige stille Mutationen im Bereich der Primersequenz erzeugt. Der verwendete Reaktionsansatz sowie das Denaturierung, Primer-Anlagerung sowie DNA-Synthese umfassende Amplifikationsprogramm sind im Folgenden zusammengefasst.

Reaktionsansatz:

template DNA	100ng
dNTP-Mix (10 mM/Base)	2μl
Vorwärtsprimer (100 pmol/μl)	1μl
Rückwärtsprimer (100 pmol/μl)	1μl
Reaktionspuffer (10 x, inkl. 2 mM MgCl ₂)	5μl
Pwo-Polymerase (2,5 U/μl)	0,5μl
H ₂ O	ad 50μl

Temperaturprogramm:

Temperatur	Zeit	Zyklen	Vorgang
95 °C	5 min	1	initiale Denaturierung
95 °C	30 s	35	Denaturierung
65 °C	45 s		Primer-Anlagerung
72 °C	70 s		Elongation
72 °C	7 min	1	verlängerte Extension
4 °C	gehalten		Lagerung

2.2.7 Enzymatische Modifikation von DNA**2.2.7.1 Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen**

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen kann DNA sequenzspezifisch an Restriktionschnittstellen gespalten werden. Der Verdau erfolgte mit vom Enzymhersteller angegebenen Reaktionspuffer und Enzymkonzentration standardmäßig in einem 50 µl-Ansatz. Die Inkubationsdauer richtete sich dabei nach dem jeweiligen Enzym bzw. Ansatz und variierte von 1 h bis ÜN. Verdau-Ansätze mit mehreren Enzymen wurden bei gleichen Reaktionsbedingungen simultan durchgeführt, ansonsten erfolgten sie sequentiell.

2.2.7.2 Dephosphorylierung der 5'-Enden der Vektoren

Um während der sich anschließenden Ligation eine Religation der Vektorenden nach einem Restriktionsverdau zu verhindern, wurden die freien 5'-Enden mittels alkalischen Phosphatase aus Garnelen (*shrimp alkaline phosphatase*, SAP) nach Herstellerangaben dephosphoryliert.

2.2.7.3 Ligation

Ligation von DNA-Fragmenten ermöglicht die kovalente Verknüpfung freier 5'-Phosphatenden mit 3'-OH-Enden. Dazu wurden ca. 100 ng Vektor-DNA in einem 20 µl-Ansatz eingesetzt. Die Menge des zugegebenen Inserts variierte je nach Größe von 1-10 x molarem Überschuss. Standardmäßig wurden Ligationen mit der T4-Ligase für 15 min bei RT in *Quick Ligation Buffer* durchgeführt. Anschließend erfolgte die Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (DH10B).

Quick Ligation Buffer (2x)	132 mM Tris-HCl, pH 7,6
	20 mM MgCl ₂
	2 mM DTT
	15 % PEG 6000
	2 mM ATP (frisch zusetzen)

2.2.7.4 Klonierung rekombinanter Spinnenseidenproteine

Um Cystein-Mutanten des rekombinanten Spinnenseidenproteins eADF4(C16) zu erhalten, wurde entweder ein mutiertes C-Modul an das amino- bzw. carboxyterminale Ende von eADF4(C16) angefügt oder eine 14 Aminosäuren umfassende Sequenz am Aminoterminal integriert.

Zur Klonierung des jeweiligen DNA-Konstrukts wurde das von Hümmerich *et al.* (Huemmerich *et al.*, 2004a) beschriebene Klonierungssystem verwendet. Die durch Mutations-PCR hergestellte veränderte Sequenz für das Modul C* (C^{S25C}, welches eine Mutation von Serin an Position 25 zu Cystein beinhaltet) wurde über Verdau mit *Bam*HI und *Hind*III in den Vektor pAZL kloniert und als pAZL-C* bezeichnet (s. Anhang, Abb. 10.7).

Die Hybridisierung der komplementären synthetischen Oligonukleotide ntag^{Cys}-fwd und ntag^{Cys}-rev (s. 2.1.1 und 2.2.5) erzeugte doppelsträngige DNA mit zu den Schnittstellen von *Bam*HI und *Hind*III komplementären überhängenden Einzelsträngen. Klonierung in den entsprechend gespaltenen Vektor pAZL generierte das Plasmid pAZL-ntag^{Cys}.

Zum Anfügen der jeweiligen Konstrukte an die für eADF4(C16) kodierende Sequenz (pAZL-C16) wurde das designierte 5'-terminale Fragment durch Verdau des Vektors mit *Bsg*I und *Bsa*I erzeugt. Der Vektor mit dem später 3'-terminalen Fragment wurde mit *Bse*RI und *Bsa*I gespalten (s. Anhang, Abb. 10.7). Durch Ligation beider Fragmente wird eine nahtlose Verknüpfung der Ausgangssequenzen erreicht. Zudem wird das durch *Bsa*I geschnittene Ampicillinresistenzgen wieder ligiert, was die Selektion positiver Klone erleichtert. Auf diese Weise wurden die Plasmide pAZL-C16C*, pAZL-C*C16 und pAZL-ntag^{Cys}C16 erzeugt.

Die so erzeugten Gene wurden unter Verwendung von *Bam*HI und *Hind*III in den Vektor pET21a eingefügt. Dadurch erhalten die Konstrukte aminoterminal eine Sequenz, welche für den T7-Peptidtag (MASMTGGQQMGR) kodiert und zum spezifischen Proteinnachweis verwendet wurde (Kroll *et al.*, 1993), sowie ein Ampicillinresistenzgen. Zur Expression im Bioreaktor wurden die Konstrukte aus pET21a in den Vektor pET29b kloniert, welcher ein Gen für Kanamycinresistenz trägt und somit besser für längere Anzuchtdauer geeignet ist. Die Vektorkarten der drei Konstrukte sind im Anhang (Abb. 10.8) gezeigt, die jeweilige Proteinsequenz in Kapitel 10.5.

2.2.8 Expression synthetischer Spinnenseidengene in *E. coli* und Reinigung rekombinanter Spinnenseidenproteine

2.2.8.1 Expressionskinetik und Löslichkeitsbestimmung

Um die optimalen Kulturbedingungen zur Expression der für die Cys-Varianten von eADF4(C16) kodierenden DNA-Konstrukte zu bestimmen, wurden zunächst Expressionskinetiken in kleinem Maßstab durchgeführt. Hierzu wurden 200 ml LB-Flüssigmedium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt und mit einer ÜN-Kultur beimpft, wobei die optische Dichte OD₆₀₀ zwischen 0,05 und 0,1 eingestellt wurde. Die Inkubation erfolgte bei verschiedenen Temperaturen (25 °C, 30 °C, 37 °C), außerdem wurde die Konzentration an IPTG zur Induktion der Expression variiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben genommen, welche mittels SDS-PAGE analysiert wurden. Das Pellet von 1 ml Bakterienkultur wurde dazu mit 160 µl 1x Auftragspuffer (nach Lämmli, wahlweise mit bzw. ohne Zusatz von β-Mercaptoethanol, s. 2.3.1.1) je 1 OD₆₀₀ aufgenommen.

Um zu überprüfen, ob die Proteine in löslicher Form vorlagen, wurden die jeweiligen Bakterienpellets in 200 µl Lysepuffer resuspendiert und durch drei Einfrier-Auftau-Zyklen (in flüssigem N₂) aufgeschlossen. Durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 30 min bei 4 °C wurden lösliche und unlösliche Zellbestandteile getrennt. Das resultierende Pellet wurde in 250 µl 1x Auftragspuffer aufgenommen, dem Überstand (200 µl) 50 µl 5x Auftragspuffer zugesetzt. Die weitere Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunoblot.

Lysepuffer:	20 mM	HEPES pH 7,5
	100 mM	NaCl
	0,2 mg/ml	Lysozym

2.2.8.2 Fed batch-Fermentation

Zur Fermentation im Liter-Maßstab (2-4 l) wurden zunächst 50 ml LB-Medium mit Antibiotika-Zusatz mit einer Einzelkolonie angeimpft und ÜN bei 37 °C inkubiert. Diese Vorkultur diente zur Inokulation des Fermentationsmediums in einem Minifors Bioreaktor (Infors). Antibiotikum (Kanamycin, Endkonzentration 35 µg/ml) wurde frisch unter sterilen Bedingungen zugegeben. Durch Zusatz eines Antischaummittels (Breox FMT 30) sollte übermäßige Schaumbildung innerhalb des Reaktors vermieden werden.

Bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ zwischen 40 und 45 wurde die Kultur bei 37 °C und einer Rührerdrehzahl von 800-900 rpm inkubiert. Der pH-Wert des Mediums wurde durch Zugabe von 2,5 M H₃PO₄ bzw. 2,5 M NaOH im Bereich zwischen 6,5 und 7,5 stabilisiert und der Sauerstoffgehalt durch Zufütterung entsprechender Mengen Glukoselösung (40 % w/v) bei einer Sättigung von 20-40 % gehalten. Die Expression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG

induziert. Je nach fermentiertem Protein wurde die Kultur bei verschiedenen Temperaturen für 3 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Ernte der Zellen durch Sedimentation bei 6000 rpm für 15 min bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen des Pellets mit Aufschlusspuffer wurde es in Aufschlusspuffer (etwa 250 ml je 100 g Biomasse) resuspendiert und bis zur Reinigung bei -20 °C gelagert.

Expressionsbedingungen:	Protein	Temperatur
	ntag ^{Cys} C16	25 °C
	C16C*	30 °C
	C*C16	30 °C
Fermentationsmedium:	1,62 % (w/v)	Trypton/Pepton
	2,48 % (w/v)	Hefeextrakt
	15,8 mM	KH ₂ PO ₄
	40,7 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	0,75 mM	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
	4,38 mM	MgSO ₄
		pH 7,0
Aufschlusspuffer:	50 mM	Tris-HCl pH 7,5
	100 mM	NaCl

2.2.8.3 Reinigung rekombinanter Spinnenseidenproteine

Die Reinigung der Cys-Varianten erfolgte weitgehend nach dem für eADF(C16) etablierten Protokoll (Huemmerich *et al.*, 2004a). Der nach der Ernte der Zellen bei -20 °C gelagerten Bakteriensuspension wurde nach dem Auftauen der Protesase-Inhibitor PMSF (1:200 verdünnt aus einer 100 mM Stammlösung in Isopropanol) zugesetzt. Zudem wurden alle Schritte (bis zur Fällung der Proteine) zügig und soweit möglich gekühlt durchgeführt. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Hochdruckhomogenisator (4 Durchläufe mit jeweils 800 bar). Anschließend wurden lösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 20000 rpm (47808 g) für 30 min bei 4 °C von Zelltrümmern abgetrennt. Der Überstand, welcher die Cys-Varianten enthält, wurde für 20 min bei 80 °C inkubiert, wobei die Spinnenseidenproteine durch ihre hohe Temperaturbeständigkeit in Lösung verbleiben, während ein Großteil der *E. coli* Proteine gefällt wird. Die präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation bei 10000 rpm (17696 g) für 30 min bei 4 °C aus der Lösung entfernt. Anschließend wurden die Seidenproteine durch Zugabe von Ammoniumsulfat (Endkonzentration in der Lösung 20 %) gefällt und nach 40-60 min durch Zentrifugation bei 10000 rpm für 30 min sedimentiert. Das erhaltenen Pellet wurde einmal mit 8 M Urea und anschließend dreimal mit H₂O_{MQ} gewaschen. Zur Lagerung wurden die Proben anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und ÜN (oder bis zur Trocknung) lyophilisiert.

2.3 Proteinanalytische Methoden

2.3.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Um Proteine ihrer Größe entsprechend aufzutrennen, wurden sie in Polyacrylamid-Gelen einer Elektrophorese unterzogen. Hierbei werden die Proteine durch die Maschengröße des verwendeten Gels in ihrem Laufverhalten beeinträchtigt, so dass die Größe und Form der Moleküle ihre Laufgeschwindigkeit beeinflusst. Während in der Nativ-PAGE Proteine in nativer Form aufgetragen werden, findet die SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen statt. Das zugesetzte SDS bindet unspezifisch an Proteine und maskiert deren Eigenladung, so dass hier eine Auftrennung nach Molekülgröße ohne Beeinflussung durch weitere Faktoren (Ladung, Tertiärstruktur, etc.) erfolgt.

2.3.1.1 SDS-PAGE

Standardmäßig erfolgte die Analyse mittels SDS-PAGE, wobei Gele mit 10 % Polyacrylamid, sowie kommerzielle Tris/Glycin Gradientengele (*ServaGel*TM) mit 4-20 % Acrylamid eingesetzt wurden. Die Proben wurden vor Auftrag auf das Gel in 1x Auftragspuffer (nach Lämmli) für 5 min auf 95 °C erhitzt wurden. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA je Gel (bzw. 30 mA bei Gradientengelen) für 50 min (bzw. 60-75 min) durchgeführt. Als Referenz zum Abschätzen des Molekulargewichts wurden zusätzlich Proteinstandards aufgetragen.

Zur Analyse der Disulfidverbrückung wurde wahlweise Auftragspuffer ohne β -Mercaptoethanol verwendet und auf das Erhitzen der Proben verzichtet, um Temperatur-induzierte Oxidation zu vermeiden.

Trenngel:	1 × Trenngelpuffer; 10 %-15 % Acrylamid, 0,2 % SDS, 0,065 % (w/v) APS, 0,033 % (v/v) TEMED
Sammelgel:	1 × Sammelgelpuffer; 3 % Acrylamid, 0,2 % SDS, 0,13 % (w/v) APS, 0,066 % (v/v) TEMED

Lösungen:

Acrylamid (Rotiphorese):	38 % (w/v) Acrylamid, 2 % Bisacrylamid
Auftragspuffer (5x Lämmli):	300 mM Tris/HCl (pH 6,8), 50 % (v/v) Glycerin, 10 % (w/v) SDS, 0,05 % Bromphenolblau, 10 % β -Mercaptoethanol (optional)
Trenngelpuffer (4x):	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,8 % (w/v) SDS
Sammelgelpuffer (2x):	250 mM Tris/HCl (pH 6,8), 0,4 % (w/v) SDS
Laufpuffer (10x):	250 mM Tris/HCl (pH 8,8), 2 M Glycin (v/v), 1 % (w/v) SDS

2.3.1.2 Nativ-PAGE

Um eventuell auftretende Dimerisierung/Oligomerisierung über nicht-kovalente Interaktionen zu detektieren, wurde eine PAGE der Proteine in nativem Zustand durchgeführt. Hierzu

wurde ein 4-12 % Gradientengel (*ServaGel*TM) verwendet und die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 10 mA über 5 h. Der Auftragspuffer sowie der Laufpuffer entsprachen dabei den oben angegebenen der SDS-PAGE, allerdings ohne Zusatz von SDS und β -Mercaptoethanol.

2.3.1.3 Silberfärbung

Um die Proteine nach Auftrennung mittels PAGE sichtbar zu machen, wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Die Nachweisgrenze liegt dabei bei etwa 5-10 ng.

Die Silberfärbung wurde wie folgt durchgeführt: Die Proteine wurden im Gel für 5-20 min mit Fixierlösung I und anschließend für 30 min (wahlweise ÜN bei 4 °C) in Fixierlösung II fixiert. Nach Waschen und Rehydratisierung des Gels in H₂O_{MQ} (4 x 5 min) wurde die Silbernitrat-Lösung zugesetzt und das Gel für 30-40 min unter Lichtausschluss inkubiert. Nach kurzem Waschen mit H₂O_{MQ} wurde das Gel mit Entwicklerlösung behandelt, bis die gewünschte Färbintensität erreicht war. Die Reaktion, bei der Silbernitrat zu elementarem Silber reduziert wird, wurde durch Zugabe von 50 mM EDTA durch Komplexierung der restlichen Silberionen gestoppt.

Fixierlösung I:	30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Fixierlösung II:	0,4 M Natriumacetat pH 6,0, 0,5 % (v/v) Eisessig, 30 % (v/v) Ethanol; auf 100 ml frisch zugefügt: 0,1 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃
Färbelösung:	6 mM AgNO ₃ , 0,025 % (v/v) Formaldehyd
Entwicklerlösung:	235 mM Na ₂ CO ₃ , 0,36 % (v/v) Formaldehyd
Stopplösung:	50 mM EDTA pH 7,5

2.3.1.4 Fluoreszenz-Imaging

Um Fluorescein-markierte Proteine nach Auftrennung mittels PAGE zu detektieren, wurde ein Fluoreszenz-Imager (Ettan DIGE, *GE Healthcare*) verwendet. Die Anregung von Fluorescein erfolgte bei 480 nm, die Emission wurde bei 530 nm detektiert.

2.3.2 Immunoblot (Western Blot)

Zur Identifikation der Proteine wurde ein immunologischer Nachweis des durch den Expressionsvektor pET21a angefügten T7-tags durchgeführt. Hierzu wurden die in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine durch Anlegen einer Spannung aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. In einer *SemiDry Western Blotting* Apparatur wurden folgende Lagen übereinander geschichtet: Whatman®-Papier (4 Stück), PVDF-Membran, Gel, Whatman®-Papier (4 Stück). Als Vorbehandlung wurde die Membran durch 10 s Inkubation in Methanol aktiviert und anschließend rehydriert, alle weiteren Lagen kurz in

WB-Inkubationspuffer getränkt. Der Proteintransfer wurde bei einer konstanten Stromstärke von 100 mA pro Gel über 60 min durchgeführt.

Für den anschließenden immunologischen Nachweis wurden freie Bindungsstellen auf der Membran durch Schwenken in 5 %-iger Milchpulver-Lösung für mindestens 30 min abgesättigt. Danach wurde die Membran entweder ÜN bei 4 °C oder 90 min bei RT mit einer geeigneten Verdünnung des primären Antikörpers inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,03 % Tween 20 wurde der Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper für 45 min zugegeben. Nach erneutem Waschen (s. oben) wurden gebundene Antikörper-Komplexe mittels einer lichtemittierenden Reaktion mit dem *ECL western blot detection kit* entsprechend den Herstellerangaben sichtbar gemacht.

Lösungen:

WB-Inkubationspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 50 mM Glycin, 1 mM SDS, 20 % (v/v) Methanol

PBS: 4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH 7,4

Blocking Reagenz: 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS

Antikörperlösung: Antikörper entsprechend verdünnt in 2,5% (w/v) Magermilchpulver/
0,01 % Tween 20 in PBS

Primärantikörper: Maus anti-T7 tag (Verdünnung 1:10 000)

Sekundärantikörper: Ziege anti-Maus IgG-HRP (Verdünnung: 1:5 000)

2.3.3 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) ermöglicht das Auftrennen von Proteinen entsprechend ihrer Größe, genauer gesagt, ihres hydrodynamischen Radius. Unterschiedliche Permeation der Analyten in das poröse Trägermaterial mit kontrollierter Porengröße führt zu einer verzögerten Elution kleiner Moleküle im Vergleich zu größeren Partikeln, welche von den Poren ausgeschlossen werden.

Zur Analyse der Dimerisierung wurden je 50 µg (1 nM) eADF4(C16) sowie seine Cys-Varianten auf eine Superdex 200 10/300 HR Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 10 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM NaCl bei einer Laufgeschwindigkeit von 0,9 ml/min. Die Detektion erfolgte mittels UV-Absorption und Refraktometer zur Konzentrationsbestimmung sowie statischer und dynamischer Lichtstreuung.

2.3.4 Lichtstreuung

Die Messung der statischen Lichtstreuung erfolgte mittels DAWN EOS, der dynamischen Lichtstreuung mittels QELS Detektor (beides *Wyatt Technology*). Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte über das Programm Astra 5.3.4.14 (*Wyatt Technology*).

2.3.4.1 Statische Lichtstreuung

Statische Lichtstreuung ermöglicht die Bestimmung der absoluten molaren Masse und des absoluten mittleren quadratischen Radius (Trägheitsradius) ohne den Einsatz von Standards (Zimm, 1948a). Die Menge des Streulichtes, oder genauer das Rayleigh-Verhältnis R_θ (für $\theta \rightarrow 0$) ist dabei proportional dem Produkt aus molarer Masse und Konzentration.

$$R_\theta = \frac{(I_\theta - I_\theta^{LS}) \cdot r^2}{I_0 \cdot V} \sim M_W \cdot c \quad (\text{Gl. 2-1})$$

mit I_θ : Streulichtintensität bei Winkel θ
 I_θ^{LS} : Streulichtintensität des Lösungsmittels bei Winkel θ
 I_0 : Intensität des eingestrahnten Lichts
 r : Abstand zwischen Streuzentrum und Detektor
 V : Volumen der Messzelle
 M_W : molare Masse

Die Bestimmung der molaren Masse erfolgt nach der Zimm-Gleichung des Rayleigh-Debye-Gans-Modells der Lichtstreuung verdünnter Polymerlösungen (Zimm, 1948b):

$$\frac{K \cdot c}{R_\theta} = \frac{1}{M_W \cdot P_\theta} + 2 A_2 \cdot c \quad (\text{Gl. 2-2})$$

mit $K = 4\pi^2 (\text{dn/dc})^2 n_0^2 N_A^{-1} \lambda_0^{-4}$ (n_0 : Brechungsindex des Lösungsmittels, N_A : Avogadro-Konstante, λ : Wellenlänge des eingestrahnten Lichts)
 c : Konzentration des Polymers (g/ml)
 R_θ : Rayleigh-Verhältnis
 M_W : molare Masse
 A_2 : zweiter Virialkoeffizient
 P_θ : Formfaktor (s. unten)

Aus der Winkelabhängigkeit der Lichtstreuung lässt sich zudem ein Formfaktor oder Streufunktion $P(\theta)$ bestimmen (Abb. 2.1). Aus dieser wird der mittlere quadratische Radius berechnet, welcher durch Gleichung (2-3) beschrieben wird. Eine Winkelabhängigkeit der Streuung tritt allerdings nur bei sog. anisotropen Streuern, d. h. erst ab einer bestimmten Partikelgröße, auf. Die Grenze ist dabei abhängig von der verwendeten Wellenlänge und liegt bei dem hier verwendeten Laser ($\lambda = 690 \text{ nm}$) bei etwa 10 nm.

Streufunktion $P(\theta)$

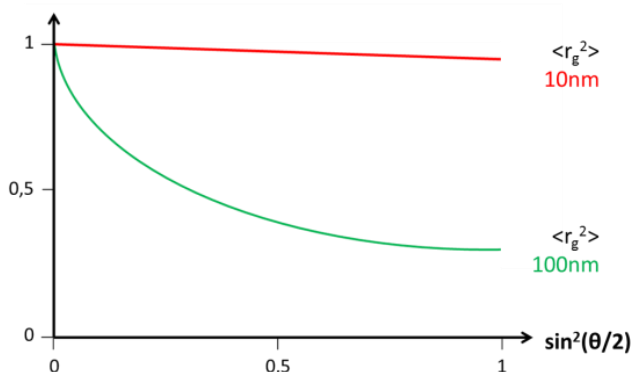


Abb. 2.1: Streufunktion $P(\theta)$ der Winkelabhängigkeit der Streulichtintensität von dem absoluten mittleren quadratischen Radius $\langle r_g^2 \rangle$.

$$\langle r_g^2 \rangle = \frac{\sum r_i^2 \cdot m_i}{M_W} \quad (\text{Gl. 2-3})$$

Die benötigte Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des angeschlossenen UV-Detektors bzw. Refraktometers unter Verwendung der jeweiligen theoretischen molaren Extinktionskoeffizienten (s. 2.5.1) bzw. des Brechungsindex-Inkrement (dn/dc) ermittelt. Als üblicher Wert von Proteinen in wässriger Lösung wurde ein dn/dc von 0,185 angenommen.

2.3.4.2 Dynamische Lichtstreuung

Im Gegensatz zur statischen Lichtstreuung wird durch dynamische oder quasi-elastische Lichtstreuung der hydrodynamische Radius von Molekülen ermittelt. Dies beruht auf der Messung der Bewegung der Teilchen im Rahmen der Braunschen Molekularbewegung. Abhängig von der Diffusionsgeschwindigkeit der Teilchen werden Interferenzen, und damit Unterschiede in der Intensität des Streulichts, erzeugt. Daraus lässt sich unter Kenntnis der Viskosität des Lösungsmittels der hydrodynamische Radius bestimmen (Stokes-Einstein-Gleichung).

$$R_h = \frac{k \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot D} \quad (\text{Gl. 2-4})$$

mit k: Boltzmann-Konstante
 T: absolute Temperatur
 η : Viskosität der Lösung
 D: Diffusionskoeffizient

2.3.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist ein Flüssigchromatographie-Verfahren, bei der eine mobile Phase unter hohem Druck über die stationäre Phase transportiert wird. Die Trennung erfolgt durch die Verteilung der Analyten zwischen mobiler und stationärer Phase. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Umkehrphasenchromatographie durchgeführt, d. h. es wurde eine unpolare Säulenmatrix, sowie eine polare mobile Phase verwendet. Durch Gradientenelution mit steigendem Gehalt an organischem Lösungsmittel werden die Wechselwirkungen der Probe mit dem Säulenmaterial geschwächt und die Probe bei Überschreiten einer kritischen Konzentration von der Matrix abgelöst.

Die Messung erfolgte an einem JASCO HPLC System (PU 2080Plus, UV Detektor UV 2075Plus und Fluoreszenzdetektor FP 2020Plus) mit einer Phenomenex Säule (Jupiter 5u C-4 300A, 250x4.6 mm). Eluiert wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min für 5min mit 2 % Puffer B, gefolgt von einem linearen Gradienten von 2-50 % Puffer B über 20 min. Die Detektion erfolgte mittels Absorptionsmessung bei 280 nm, sowie Messung der Fluoreszenz (Fluorescein-markierter Proteine) bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm.

Puffer A: 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure in H₂O

Puffer B: 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure in 90 % Acetonitril

2.3.6 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Zur massenspektroskopischen Analyse von Proteinen eignet sich das MALDI-TOF Verfahren. Es setzt sich zusammen aus der Ionisierungsart MALDI (*matrix-assisted laser desorption and ionization*) und der Massenanalyse mittels *time-of-flight* (TOF). Die Proteine werden dabei in eine Matrix eingebettet. Durch Anregung mit Laserstrahlung (verwendet wurde ein Stickstoff-Laser mit einer Wellenlänge von 337 nm, Beschleunigungsspannung 20 kV) erfolgt ein Phasenübergang, bei dem Moleküle der Matrix, sowie des darin eingebetteten Proteins explosionsartig herausgelöst werden (Lottspeich & Zorbas, 1998). Durch die in der Matrix vorhandene Säure werden Proteinionen gebildet, welche nach der initialen Beschleunigung in einem elektrischen Feld ohne Anlegen weiterer Kräfte driften. Die Flugzeit der Ionen ist proportional zu dem Quotienten aus Masse/Ladung, was die Bestimmung der Masse der Ionen ermöglicht.

Für die Analyse mittels MALDI-TOF wurden die rekombinanten Spinnenseidenproteine gegen 5 mM Tris-HCl pH 8 dialysiert und mit der Matrixlösung (20 mg/ml Sinapinsäure, 50 % Acetonitril, 0,1 % Trifluoressigsäure) vermischt (Endkonzentration des Proteins: 20 µM).

2.4 Proteinpräparative Methoden

2.4.1 Dialyse

Da die in dieser Arbeit hergestellten Proteine nach Reinigung und Gefriertrocknung nicht direkt in wässrigen Puffern löslich sind, wurden die Proteine in 6 M Guanidiniumthiocyanat denaturiert und anschließend durch Dialyse in den gewünschten Puffer überführt. Die dazu verwendeten Dialyseschläuche (*Spectra/Por*, MWCO 6000-8000 Da) wurden in Wasser aufgekocht, in 20 % Ethanol aufbewahrt und vor Benutzung mehrmals mit H₂O_{MQ} gespült. Dialysiert wurde gegen 1000-3000-faches Volumen des gewünschten Puffers für 3 h bei RT (wobei der Puffer dreimal erneuert wurde), bzw. ÜN (mit zweimaligem Pufferwechsel). Der letzte Dialyseschritt wurde hier bei 4 °C durchgeführt. Je nach Anwendung wurden verschiedene Puffer verwendet, z. B. 10 mM Tris/HCl pH 8 (für Analysen), 10 mM HEPES pH 7 für Thiol-Kopplung bzw. 5 mM NH₄HCO₃ zum Gießen von Filmen aus wässriger Lösung.

2.4.2 Reduktion und Carboxymethylierung

Zur Reduktion der teilweise Disulfid-verbrückt vorliegenden Cys-Proteine (*ntag*^{Cys}C16, C*C16 und C16C*) wurde sowohl DTT als auch TCEP verwendet. Die optimalen Reaktionsbedingungen wurden empirisch ermittelt, wobei jeweils 10-facher bzw. 100-facher

molaren Überschuss an Reduktionsmittel (in Puffer mit pH 7-8) zugesetzt und für verschiedene Zeit bei RT inkubiert wurde. Der Erfolg der Reduktion wurde mittels SDS-PAGE ohne Zusatz von β -Mercaptoethanol überprüft.

Um das (Wieder-)Ausbilden von Disulfidbrücken unabhängig vom Redoxpotential der Umgebung zu verhindern, wurden freie Thiolgruppen carboxymethyliert. Hierzu wurde Iodacetamid verwendet (Gurd, 1972). Durch nukleophile Substitution des Iod durch ein Thiolation wird dabei ein Thioether ausgebildet, welcher unter neutralen Bedingungen stabil ist. Nach erfolgter Reduktion (meist für 1 h mit 10x Überschuss an TCEP bzw. 20x Überschuss DTT) wurden 100 mM Iodacetamid zugegeben. Die Reaktion erfolgte für 1 h bei RT. Je nach sich anschließender Anwendung bzw. Analyse wurden die zugesetzten Agenzien gegebenenfalls durch Dialyse entfernt.

2.4.3 Bestimmung freier Thiolgruppen mit Ellmans Reagens (DTNB)

Zur Bestimmung freier Thiolgruppen nach Reduktion der Cys-Proteine wurde das Reduktionsmittel durch eine Entsalzungssäule (PD-10, *GE Healthcare*) entfernt. 750 μ l der erhaltenen Proteinlösung (0,75-1 mg/ml in 20 mM HEPES, pH 7) wurden mit 30 μ l DTNB-Lösung (4 mg/ml DTNB (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)) in 100 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA) versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 412 nm bestimmt und um den Absorptionswert des Kontrollansatzes ohne Protein (10 mM HEPES pH 7 mit DTNB-Lösung) korrigiert.

Die Anzahl freier Thiolgruppen pro Proteinmolekül ergab sich aus Gl. 2-5:

$$\frac{\text{mol freie Thiolgruppen}}{\text{mol Protein}} = \frac{A_{412}}{\epsilon_{(\text{DTNB-SH})} \cdot c} \quad (\text{Gl. 2-5})$$

mit c: Proteinkonzentration (mol/l)
 $\epsilon_{412\text{nm}}(\text{DTNB-SH}): 13\,600\,\text{M}^{-1}\,\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{276\text{nm}}(\text{ntag}^{\text{Cys}}_{\text{C16}}): 47\,680\,\text{M}^{-1}\,\text{cm}^{-1}$

2.4.4 Redox Titration

Mit Hilfe einer Redox Titration wurde das Redoxpotential der Cystine der Cys-Varianten von eADF4(C16) abgeschätzt. In Anlehnung an das für die Cystine der NR-Regionen von ADF3 und ADF4 entwickelte Protokoll (Huemmerich, 2004) wurde dazu ein auf DTT basierendes Redox-Puffersystem verwendet. Das Standardpotential bei pH 7 (E_0') liegt dabei bei -332 mV (Cleland, 1964). In einer zweistufigen Reaktion wird das Cystin (über die Zwischenstufe eines gemischten Disulfids) durch DTT zu 2 Cysteinen reduziert, wobei der zweite Reaktionsschritt mit einer um den Faktor 10^4 höheren Gleichgewichtskonstante abläuft (Cleland, 1964). Dadurch verläuft die Reduktion quantitativ, was die Auswertung der Redox Titration erleichtert, da mögliche Zwischenprodukte vernachlässigt werden können.

Die Proteine wurden in einer Konzentration von 0,5 mg/ml in entgasten Lösungen mit verschiedenen Redoxpotentialen für 1 h bei RT inkubiert. Das Potential der Lösung berechnete sich dabei aus dem Mischungsverhältnis von DTT_{ox} (trans-4,5-Dihydroxy-1,2-dithian) und DTT_{red} (Dithiothreitol) nach der Nernstschen Gleichung (s. unten). Anschließend wurden freie Thiole carboxymethyliert, die Proben mit Hilfe eines 4-20 %-igen Tricine Gels (ServaGel™) aufgetrennt und die Proteinbanden durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

Aus der Nernst-Gleichung abgeleitet entspricht das Potential derjenigen Lösung, in der die Proteine zu gleichen Teilen als Monomer und Dimer vorlagen, dem Standard-Redoxpotential ihres Cystins.

Nernst-Gleichung:
$$E' = E_0' - \frac{RT}{nF} * \ln \frac{[red]}{[ox]} \quad (\text{Gl. 2-6})$$

mit E': Redoxpotential bei pH 7
 E₀': Standardpotential bei pH 7
 R: Gaskonstante
 T: absolute Temperatur
 n: Anzahl der Elektronen
 F: Faradaykonstante
 [red], [ox]: Konz. der reduzierten bzw. oxidierten Spezies

Titrierlösung (entgast):	0,5 mg/ml	Protein
	100 mM	MOPS pH 7
	1 mM	EDTA
	20 mM	DTT (oxidiert bzw. reduziert)

Tabelle 2.1: Mischungsverhältnisse von von DTT_{ox} (trans-4,5-Dihydroxy-1,2-dithian) und DTT_{red} (Dithiothreitol) sowie das daraus resultierende Redoxpotential

DTT _{red}	DTT _{ox}	Redoxpotential [V]
0.18	99.82	-0.25
0.39	99.61	-0.26
0.86	99.14	-0.27
1.87	98.13	-0.28
4.04	95.96	-0.29
8.51	91.49	-0.30
17.03	82.97	-0.31
31.18	68.82	-0.32
50.00	50.00	-0.33
68.82	31.18	-0.34

2.4.5 Filmpräparation

Proteinfilme wurden durch Gießen einer Proteinlösung auf ein Substrat und anschließendes Abdampfen des Lösungsmittels hergestellt. Bei Wahl geeigneter Parameter entsteht dabei aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen ein stabiler, transparenter Film, der, je nach verwendetem Substrat und Filmdicke, von dem Substrat abgezogen werden kann. Die Dicke

des entstehenden Films kann dabei über die verwendete Proteinkonzentration bzw. die Proteinmenge pro Fläche eingestellt werden.

In dieser Arbeit wurden Filme aus eADF4(C16) sowie der Cys-Proteine *ntag^{Cys}C16*, C16C* und C*C16 aus Lösungen in HFIP, Ameisensäure und Puffer hergestellt. Die Proteinkonzentration betrug dabei in Puffer 3 mg/ml (0,3 % (w/v)), in den organischen Lösungsmitteln wurde sie je nach Verwendungszweck und Substrat variiert. Zur Herstellung dicker Filme ($\geq 1 \text{ mg/cm}^2$) wurden 3-4 %-ige (w/v) Lösungen verwendet, für dünne Filme (z. B. $0,15 \text{ mg/cm}^2$) 0,3-1 %-ige (w/v) Lösungen. Um eventuell während der Dialyse in wässrigen Puffer entstandene Aggregate aus der Lösung zu entfernen, wurden wässrige Proteinlösungen direkt vor Gießen des Filmes für 1 h bei 10 °C mit 55.000 rpm zentrifugiert. In den organischen Lösungsmitteln waren alle Proteine direkt löslich.

Als Substrate kamen Polystyrol – in Form von Petrischalen und Zellkulturplatten – sowie Teflon und Glas zum Einsatz.

Um die Bedingungen der Filmherstellung, -trocknung sowie -lagerung möglichst konstant und reproduzierbar zu halten, wurden die Filme in einer Kammer mit kontrollierbarer Luftfeuchtigkeit hergestellt. Soweit nicht anders angegeben, wurde die relative Luftfeuchtigkeit (LF) bei 30 % gehalten. Die Trocknung der Filme erfolgte für mindestens 4 h, meist ÜN.

Zur (optionalen) Nachbehandlung wurden die Filme ÜN mit der entsprechenden Lösung (Methanol oder Ethanol abs. bzw. 70 % oder 1 M Kaliumphosphat pH 8) überschichtet und ÜN bei kontrollierter LF inkubiert. Um ein vorzeitiges Verdampfen des Alkohols zu vermeiden, wurden die überschichteten Filme leicht abgedeckt.

2.4.6 Kopplung an Thiole der Cys-Varianten von eADF4(C16)

Zur Modifizierung der Cysteine in *ntag^{Cys}C16*, C16C* sowie C*C16 wurden Maleimid-funktionalisierte Agenzien verwendet. Die Reaktion von Maleimid mit Thiolen ist sowohl spezifisch als auch effektiv (Heitz *et al.*, 1968; Partis *et al.*, 1983), wobei die Spezifität der Reaktion pH-Wert abhängig ist. Bei pH 7 beispielsweise ist die Reaktivität gegenüber Thiolen etwa 1000-fach höher als gegenüber primären Aminen (Brewer & Riehm, 1967). Bei Erhöhung des pH-Werts steigt die Nukleophilie des Amins, und die Spezifität der Reaktion für Thiole sinkt dementsprechend. Der Reaktionsmechanismus besteht in einer Addition des Thiols an das α,β -ungesättigte System des Maleimids unter Ausbildung eines stabilen Thioethers (Michael-analoge Addition), wie im Folgenden für die Reaktion von *ntag^{Cys}C16* mit Fluorescein-5-Maleimid gezeigt ist.

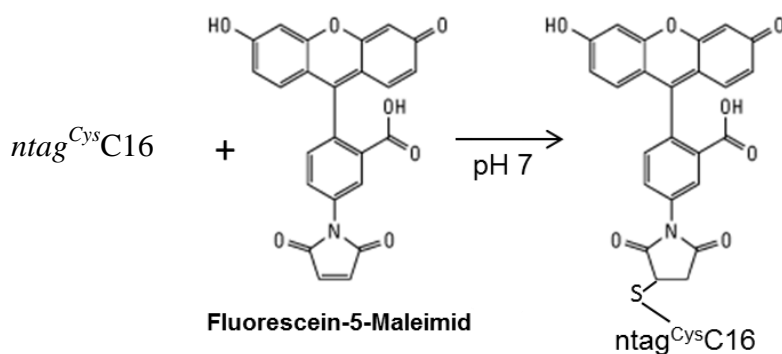


Abb. 2.2: Reaktion von Fluorescein-5-Maleimid mit $ntag^{Cys}C16$

Rekombinante Cys-Proteine wurden sowohl in Lösung als auch nach Assemblierung zu Filmen mittels Reaktion mit Maleimid-Gruppen modifiziert.

2.4.6.1 Kopplung in Lösung

In Lösung wurde Fluorescein-5-Maleimid sowie mit SMCC (Succinimidyl trans-4-(maleimidylmethyl)cyclohexan-1-carboxylat und Fluorescein modifiziertes RGD-Peptid c(RGDfK) (Abb. 3.23 a und 2.1.1.2) an $ntag^{Cys}C16$ angefügt. Analog dazu erfolgte die Kopplung des analogen, Fluorescein-freien, zyklischen RGD-Peptids.

Nach Dialyse und Reduktion des Proteins (2 mg/ml in 10 mM HEPES pH 7) mit 10-fachem molarem Überschuss an TCEP für 1 h wurde das zu koppelnde Maleimid aus einer 20 mM Stammlösung in DMF in 10-15-fachem molaren Überschuss zugegeben und unter Lichtausschluss für 2 h bei RT inkubiert. Um das (modifizierte) Protein von überschüssigem Maleimid zu trennen, wurde es durch Zugabe von Kaliumphosphat pH 8 (Endkonzentration 1 M) gefällt. Bei dieser quantitativen Fällung bilden eADF4(C16), sowie seine Cys-Varianten β -Faltblatt-reiche, wasserunlösliche Mikrokugeln (Slotta *et al.*, 2008). Diese wurden durch dreimaliges Waschen (Zentrifugation jeweils 15 min bei 13300 rpm) mit H_2O_{MQ} von restlichem Reagens abgetrennt. Anschließend konnte das Protein lyophilisiert und gelagert werden oder wurde zur weiteren Analyse in 6 M Guanidiniumthiocyanat gelöst und gegen 10 mM Tris/HCl pH 8 dialysiert.

Die Kopplungseffizienz wurde aus der Absorption bei 280 nm und 493 nm nach Gleichung 2-7 berechnet:

$$\frac{\text{mol Fluorescein}}{\text{mol Protein}} = \frac{A_{493}}{\epsilon_{(\text{Fluorescein-Maleimid})} \cdot C} \quad (\text{Gl. 2-7})$$

mit Proteinkonzentration $C = \frac{A_{280} - (A_{493} \cdot CF)}{\epsilon_{(ntag^{Cys}C16)}}$; Korrekturfaktor $CF = \frac{A_{280}}{A_{493}} = 0,3$

$$\epsilon_{276nm} (ntag^{Cys}C16): 47\,680\, M^{-1}\, cm^{-1}; \epsilon_{493nm} (\text{Fluorescein-Maleimid}): 70\,000\, M^{-1}\, cm^{-1}$$

2.4.6.2 Kopplung an assemblierte Filme

Zur Modifikation bereits zu Filmen assemblierter Cys-eADF4(C16)-Proteine wurden die Filme standardmäßig aus einer 1 % (w/v) Proteinlösung in HFIP hergestellt. Je nach weiterer Verwendung wurden sie in 24-*well* Platten (Fläche der Kavität 1,1 cm², Material: Polystyrol) bzw. 96-*well* Platten (Fläche 0,33 cm², Material: Polystyrol) gegossen. Durch Methanol abs.-Behandlung wurden die Filme wasserunlöslich gemacht. Zur Reduktion der Disulfide wurde TCEP-Lösung (4 mM in 100 mM HEPES pH 7) zugegeben. Nach 1,5 h bei RT wurde das zu koppelnde Maleimid-Konjugat aus einer Stammlösung (bei Fluorescein in DMF, ansonsten im jeweiligen Puffer) in die TCEP-Lösung pipettiert (10 x molarer Überschuss) und 2-4 h bei RT oder ÜN bei 4 °C auf einer Schwenkplatte inkubiert. Um ungebundene Agenzien zu entfernen, wurden mehrere Waschschrte durchgeführt (2 x 0,1 M HEPES pH 7, 0,1 % (v/v) Tween 20; 1 x 0,1 M HEPES pH 7; 1 x 0,1 M HEPES pH 7, 1 M NaCl; 2 x 0,1 M HEPES pH 7; 2 x H₂O₂). Durch Tween 20 werden hierbei hydrophobe und durch Natriumchlorid elektrostatische Wechselwirkungen unterbunden.

Zur Analyse wurde die erfolgte Kopplung entweder direkt auf den Filmen oder nach Lösen in 6 M Guanidiniumthiocyanat und anschließender Dialyse untersucht. Fluorescein (Fluorescein-X5-Maleimid sowie Fluorescein-markiertes c(RGDfK)) wurde mittels eines Fluoreszenz-Imagers (Ettan DIGE, *GE Healthcare*; Anregung: 480 nm, Emission: 530 nm) oder im Fluoreszenzspektrometer (*Jasco* FP-6500; s. 2.5.2) detektiert. Gebundenes Maleimid-PEO₂-Biotin wurde sowohl auf dem Film als auch nach Auflösen des Films und Durchführen eines Westernblots über die spezifische Reaktion mit Streptavidin-AP nachgewiesen. Nach Waschen (s. oben) wurde gebundene alkalische Phosphatase (AP) durch Zugabe einer BCIP/NBT-Substratlösung visualisiert, wobei ein bläulich-lila Niederschlag gebildet wird.

Kopplung von Nanogold

Zur Kopplung von Goldpartikeln (Monomaleimido-Nanogold, *Nanoprob*) wurden dünnere Filme aus 5 µl 0,1 % (w/v) Proteinlösung in HFIP direkt auf unbeschichtete TEM-Netzchen (400 mesh, vergoldet, *Plano*) gegossen. Bei dickerer Proteinschicht konnten die Goldpartikel im TEM aufgrund der hohen Absorption des Proteins nicht selektiv detektiert werden. Die Kopplung erfolgte direkt auf den Netzchen, wobei diese auf Gefäße mit der jeweiligen Inkubationslösung mit der Oberfläche nach unten aufgelegt wurden. Nach Vorbehandlung der Filme wie oben beschrieben erfolgte die Kopplungsreaktion in 2 mM Natriumphosphat pH 6,5, 0,1 mM EDTA, 15 mM NaCl, 1 mM TCEP bei 4 °C. Wiederum wurde gründlich gewaschen, um ungebundenes Nanogold zu entfernen. Immobilisierte Partikel wurden durch Inkubation mit GoldenhanceTM (*Nanoprob*) nach Herstellerangaben verstärkt. Je nach

Inkubationsdauer lagert sich dabei eine unterschiedlich dicke Goldschicht spezifisch an den Goldpartikeln ab. Verstärkung für 2 min lieferte beispielsweise Partikel mit 2-5 nm Durchmesser. Die Analyse der modifizierten Filme erfolgte mittels Transmissions-elektronenmikroskopie (s. 2.6.3).

Kopplung von β -Galaktosidase

Das Enzym β -Galaktosidase wurde über einen heterobifunktionellen Crosslinker (NHS-PEO₁₂-Maleimid, s. 2.1.1.2) an Spinnenseidenfilme gebunden. N-Hydroxysuccinimid-Ester reagieren unter Freisetzung von N-Hydroxysuccinimid hauptsächlich mit primären Aminen. Dabei bilden sich stabile Amidbindungen aus. Um sterische Hinderungen bei der Kopplung zu minimieren, wurde mit PEO₁₂ ein langer Spacer gewählt.

In einem ersten Reaktionsschritt wurde β -Galaktosidase (10 mg/ml in PBS pH 7,5) für 2 h bei 4 °C unter Rotieren mit 2 μ l Crosslinker inkubiert. Überschüssiger Linker wurde anschließend mittels einer Entsalzungssäule (Sephadex G25, *GE Healthcare*) entfernt. Zur Elution des Enzyms wurde 100 mM HEPES pH 7 verwendet. Diese Lösung wurde auf bereits reduzierte Filme gegeben und unter Zusatz von 2 mM TCEP ÜN bei 4 °C geschwenkt. Die nachfolgenden Waschschritte erfolgten analog zu den oben beschriebenen. Um die Enzymaktivität der β -Galaktosidase nachzuweisen, wurde X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galacto-pyranosid) in Inkubationspuffer (s. unten) als Substrat zugegeben. Durch enzymatische Spaltung wird daraus das tiefblaue 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo gebildet.

Inkubationspuffer für X-Gal:	100 mM	Natriumphosphat pH 7
	10 mM	KCl
	1 mM	MgSO ₄
	50 mM	β -Mercaptoethanol
	0,2 mg/ml	X-Gal (aus Stammlösung in DMSO)

2.5 Spektroskopische Methoden

2.5.1 UV-Vis Absorptionsspektroskopie

Die Methode der UV-Vis-Absorptionsspektroskopie wurde zur Konzentrationsbestimmung der Proteine in Lösung sowie von Fluorescein verwendet. Der Zusammenhang zwischen Konzentration, wellenlängenabhängigem Extinktionskoeffizienten und gemessener Extinktion ist im Lambert-Beerschen Gesetz beschrieben:

$$E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (\text{Gl. 2-8})$$

mit	E_{λ} : Extinktion bei der Wellenlänge λ
	ϵ_{λ} : molarer Extinktionskoeffizient bei Wellenlänge λ
	c: (Protein)-Konzentration (mol/l)
	d: Schichtdicke der Küvette (cm)

Der Extinktionskoeffizient lässt sich für Proteine aus deren Primärstruktur ermitteln. Den Hauptbeitrag zur Absorption im Proteinspektrum liefern dabei Tryptophan und Tyrosin, sowie in geringerem Ausmaß auch Phenylalanin und Cystin (Cantor & Schimmel, 1980; Pace & Schmid, 1997). Für die verwendeten rekombinanten Spinnenseidenproteine wurde der Extinktionskoeffizient basierend auf der Methode nach Gill und Hippel bzw. Pace *et al.* mit Hilfe des Programms ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) nach folgender Formel bestimmt (Gill & von Hippel, 1989) (Pace *et al.*, 1995):

$$\varepsilon_{\lambda}(\text{Protein}) = \varepsilon_{\lambda}(\text{Trp}) \cdot n(\text{Trp}) + \varepsilon_{\lambda}(\text{Tyr}) \cdot n(\text{Tyr}) + \varepsilon_{\lambda}(\text{Cystin}) \cdot n(\text{Cystin}) \quad (\text{Gl. 2-9})$$

Tabelle 2.2: Extinktionskoeffizienten der in der Arbeit verwendeten rekombinanten Spinnenseidenproteine

Protein	Molarer Extinktionskoeffizient ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
eADF4(C16)	$\varepsilon_{276\text{nm}} = 46400$
ntag ^{Cys} C16	$\varepsilon_{276\text{nm}} = 47680$
C*C16, C16C*	$\varepsilon_{276\text{nm}} = 50680$

2.5.2 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie basiert auf der Anregung von Elektronen eines Fluorophors durch Licht bestimmter Wellenlänge und anschließender Emission elektromagnetischer Strahlung bei Rückkehr der angeregten Elektronen in ihren Grundzustand. Dabei ist die emittierte Strahlung energieärmer, d. h. langwelliger, als die des Anregungslichts (Stokes-Verschiebung). In dieser Arbeit wurde einerseits die auf den aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin beruhende intrinsische Fluoreszenz von Proteinen zur Abschätzung der Reinheit der rekombinanten Proteine verwendet, da diese kein Tryptophan besitzen. Andererseits wurde die spezifische Fluoreszenz des Farbstoffs Fluorescein eingesetzt, um anhand einer aufgenommenen Standardgeraden die Menge an Fluorescein in einer Probe, und damit die Kopplungseffizienz bei Markierung der Cys-Proteine, zu bestimmen.

Die Parameter der Anregung und Emissionsaufnahme wurden wie folgt gewählt:

Detektion von	Anregungswellenlänge	Aufnahme der Emission
Tyr/Trp	275 nm	290-400 nm
Trp	295 nm	310-400 nm
Fluorescein	492 nm	500-550 nm

Die Anregungsbandbreite betrug 3 nm, die Emissionsbandbreite 5 nm, und die Dämpfung 0,5 s. Alle Spektren wurden um die Pufferfluoreszenz korrigiert.

2.5.3 Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie

Als Zirkulardichroismus (engl. *circular dichroism*, CD) versteht man die unterschiedliche Absorption links- und rechts-zirkular polarisierten Lichts durch optisch aktive Substanzen. Je nach Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes wird zwischen Nah-UV-Bereich (320-250 nm) und Fern-UV-Bereich (250-170 nm) unterschieden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Fern-UV CD-Spektroskopie angewendet, welche Informationen über die Sekundärstruktur in Proteinen liefern kann. Angegeben wird die Elliptizität (mit der Einheit Milligrad, mdeg) in Abhängigkeit der Wellenlänge. Verschiedene Strukturelemente erzeugen dabei typische Minima und Maxima im CD-Spektrum, welche an Modellstrukturen wie z. B. Polylysin bestimmt wurden und im Folgenden zusammengefasst sind (Schmid, 1997; Lottspeich & Zorbas, 1998; Rath *et al.*, 2005):

Sekundärstruktur	Minima	Maxima
α -Helix	208 und 222 nm	192 nm
β -Faltblatt	218 nm	196 nm
unstrukturiert (<i>random coil</i>)	195 nm	212 nm
Poly-Prolin II Helix	200-205 nm	217-225 nm

Um einen konzentrationsunabhängigen, für ein Protein spezifischen Wert zu erhalten, wird meist die molare Elliptizität pro Aminosäurerest θ_{MRW} angegeben:

$$\theta_{MRW} = \frac{\theta \cdot 0,1}{c \cdot d \cdot n} \quad (\text{Gl. 2-10})$$

mit: θ_{MRW} : molare Elliptizität ($\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$)
 θ : gemessene Elliptizität (mdeg)
 c : (Protein)-Konzentration (mol/l)
 d : Schichtdicke der Küvette (cm)
 n : Anzahl der Peptidbindungen

Zur Analyse der Sekundärstruktur von rekombinanten Spinnenseidenproteinen mittels Fern-UV CD-Spektroskopie wurden Lösungen mit 3 μM Protein im jeweiligen Lösungsmittel (10 mM Tris/HCl pH 8, 5 mM NH_4HCO_3 pH 8, HFIP) eingesetzt. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten mit 0,1 cm Schichtdicke an einem Jasco J-715 Spectropolarimeter (Jasco, Japan) bei 20 °C. Gemessen wurde im Wellenlängenbereich von 250-190 nm mit einer Geschwindigkeit von 50 nm/s. Die Auflösung betrug 0,1 nm, die Dämpfung 1 s. Es wurden jeweils fünf Spektren gemittelt und das jeweilige Pufferspektrum subtrahiert.

2.5.4 Fouriertransformierte Infrarot- (FTIR-) Spektroskopie

Bei der Infrarotspektroskopie wird die Absorption von elektromagnetischer Strahlung im mittleren Infrarot-Bereich (bei Wellenlängen zwischen etwa 50 und 2,5 μm , entsprechend

Wellenzahlen von 200-4000 cm^{-1}) gemessen, welche spezifische Schwingungsübergänge von Molekülbindungen induziert. Die Fouriertransformierte IR-Spektroskopie wird verwendet, um ein deutlich verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis bei kurzer Messzeit zu ermöglichen. Mit Hilfe eines Michelson-Interferometers wird dabei ein Interferogramm erzeugt, welches durch anschließende Fourier-Transformation in ein Spektrum umgerechnet wird.

Im Fall von Proteinen kann die FTIR-Spektroskopie Informationen über die Sekundärstruktur liefern. Auch die Zuordnung einzelner Aminosäurereste zu bestimmten Konformationen ist teilweise möglich (Papadopoulos *et al.*, 2007). Der Hauptanteil des Spektrums wird durch Schwingungsmoden des Polypeptidrückgrats erzeugt, welches neun charakteristische Banden aufweist (Amid A und B sowie Amid I-VII) (Krimm & Bandekar, 1986). Zur Bestimmung der Sekundärstruktur werden meist die Amid I- und II- Bande herangezogen, da hier für verschiedene Sekundärstrukturen sensitive Schwingungen der Peptidgruppe des Proteinrückgrats auftreten. So wird die Amid I-Bande (bei 1600-1700 cm^{-1}) zu 80 % durch Streckschwingungen der Carbonylgruppe (C=O) hervorgerufen. Die Amid II-Bande (1500-1580 cm^{-1}) hingegen repräsentiert Biege- sowie Streckschwingungen von N-H bzw. N-C $_{\alpha}$ Bindungen. Die Stärke der bei den verschiedenen Sekundärstrukturen ausgebildeten Wasserstoffbrücken beeinflusst die Intensität und Schwingungsfrequenz der IR-Banden und ermöglicht somit die Zuordnung spezifischer Absorptionsbereiche zu individuellen Sekundärstrukturen.

FTIR-Spektren von Spinnenseidenfilmen wurden auf dem mit Trockenluft gespülten Germanium-Kristall eines Bruker Tensor 27 IR-Spektrometers im ATR-Modus (*attenuated total reflectance*, abgeschwächte Totalreflexion) aufgenommen. Dabei wurden jeweils 100 Einzelmessungen im Spektralbereich zwischen 700-4000 cm^{-1} mit einer Auflösung von 2 cm^{-1} zu einem Spektrum addiert. Die erhaltenen Spektren wurden einer atmosphärischen Kompensation durch die Software Opus 6.5 (*Bruker Optics Corp.*) unterzogen, um ein jeweils aufgenommenes Hintergrundspektrum korrigiert und gegebenenfalls Grundlinien-korrigiert.

2.5.4.1 Fourier-Selbstdekonvolution (FSD)

Zur quantitativen Analyse der Amid I-Bande wurde eine Fourier-Selbstdekonvolution (FSD) nach der von Hu *et al.* für Filme aus *B. mori* Seidenfibroin beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt (Hu *et al.*, 2006). Alle Schritte erfolgten dabei mittels der Opus 6.5 Software (*Bruker Optics Corp.*). Das Grundlinien-korrigierte und geglättete Spektrum (über 9 Punkte) wurde einer automatischen FSD unterzogen, wobei folgende Parameter gewählt wurden: Lorentz-Fit, Rauschunterdrückung: 0,3, Bandenweite: 23-26. Dabei wird das Interferogramm bei großen Spiegelauslenkungen stärker gewichtet, was zu einer höheren Feinstruktur des

Spektrums mit schärferen Banden führt. Das erhaltene Spektrum wurde mit Hilfe von Gauss-Oszillatoren aufgelöst und aus den normalisierten Integralen der einzelnen Kurven der prozentuale Anteil verschiedener Sekundärstrukturelemente berechnet. Mindestens drei individuelle Fits wurden jeweils gemittelt. Die Zuordnung erfolgte anhand folgender Tabelle (Hu *et al.*, 2006; Slotta *et al.*, 2006; Tamm & Tatulian, 1997):

Tabelle 2.3: Übersicht charakteristischer Absorptionsbereiche, die bestimmten Proteinsekundärstrukturen zugeordnet werden können.

Sekundärstruktur	Amid I (cm^{-1})	Amid II (cm^{-1})
α -helix	1656-1663	1540-1550
β -Faltblatt	1616-1637 und 1697-1703	1520-1530
β -turn (β -Schleife)	1664-1696	
Ungeordnet (<i>random coil</i>)	1638-1655	1520-1545
Sonstiges (Tyr, Arg Seitenketten, Aggregate)	1605-1615	

2.5.4.2 Polarisierte FTIR-Spektroskopie

Durch zusätzliche Verwendung von Polarisationsfiltern kann zudem die Ausrichtung bestimmter Übergangsmomente/Bindungen in der zu untersuchenden Probe analysiert werden. Entsprechende Messungen an rekombinanten Spinnenseidenfilmen wurden in Kooperation mit Roxana Ene, AG Prof. Friedrich Kremer, Institut für Experimentelle Physik der Universität Leipzig, durchgeführt. Zusätzlich wurde der Einfluss linearer, externer mechanischer Belastung auf die Orientierung bestimmter Bindungen untersucht. Hierzu wurde der in Abb. 2.3 gezeigte Messaufbau verwendet, der bereits in mehreren Publikationen der Arbeitsgruppe (Ene *et al.*, 2009; Papadopoulos *et al.*, 2009a) präsentiert wurde.

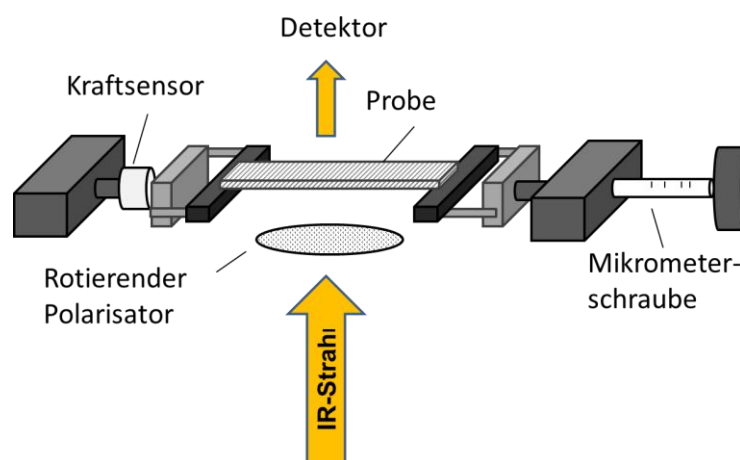


Abb. 2.3: Verwendeter Messaufbau zur Messung von polarisierten FTIR-Spektren bei gleichzeitiger linear mechanischer Belastung von eADF4(C16)-Filmen. (Erklärung s. Text)

Spinnenseidenfilme wurde dazu in Streifen von 3-4 mm Breite geschnitten und mit einem Zweikomponenten Epoxid-Kleber an der Apparatur (s. Abb. 2.3) befestigt. Mit Hilfe angebrachter Mikrometerschrauben wurde der Filme schrittweise gedehnt (Schrittweite $\sim 0,5\%$). Die dabei aufgewendete Kraft wurde mit einem Burster 8411-10 Kraftsensor (*Burster GmbH*, max. 10 N) detektiert. Nach Relaxation der Probe, d. h. ab Erreichen eines Plateaus in der Kraftkurve (nach etwa 10 min) wurden Transmissions-FTIR-Spektren mit einem Varian FTS6000 FTIR Spektrometer, ausgestattet mit einem UMA 500 IR-Mikroskop und einem photovoltaischen MCT-Detektor (KMPV50, *Kolmar Technologies*), aufgenommen. Es wurden 1024 Einzelspektren zwischen 750 und 5000 cm^{-1} mit einer nominellen Auflösung von 4 cm^{-1} akkumuliert. Ein motorbetriebener KRS-5 IR-Polarisationsfilter diente zur Aufnahme von IR-Spektren bei Polarisationswinkeln zwischen 0° und 180° (Schrittgröße 18°).

2.5.4.3 Auswertung

Der Effekt der angelegten Zugbelastung wurde für die Absorptionsbande bei $\sim 964\text{ cm}^{-1}$ analysiert, welche Polyalanin in β -Struktur zugeordnet werden kann (Papadopoulos *et al.*, 2007). Extern aufgebrachte, lineare mechanische Belastung kann bis auf Molekülbindungen wirken, was – je nach Eigenschaften der jeweiligen Schwingungen – zu Änderungen der Form und Frequenzlage der zugehörigen IR-Absorptionsbande führen kann (Papadopoulos *et al.*, 2007; Schwabl, 2002). Dementsprechend wurde die Lage des Absorptionsmaximums analysiert, und als Differenz $\Delta\tilde{\nu}$ der jeweiligen Wellenzahl von der des Maximums vor Belastung angegeben.

Als zweiter Parameter wurde aus den bei verschiedenen Polarisationswinkeln aufgenommenen Spektren ein Ordnungsparameter (ebenfalls für die β -Polyalanin Absorptionsbande) bestimmt.

Grundlage dafür ist, dass anisotrope Materialien eine richtungsabhängige Dipolmomentänderung einzelner Schwingungen zeigen. Somit variiert die Absorption bei verschiedenen Polarisationswinkeln, woraus sich auf die Orientierung der jeweilig angeregten Bindung schließen lässt. Bei Polarisation senkrecht zu der Ausrichtung der Übergangsmomente kann beispielsweise keine Absorption erfolgen. Diese Abhängigkeit kann mit der folgenden Gleichung beschrieben werden:

$$A(\theta) = -\log_{10}(10^{-A_x}\cos^2\theta + 10^{-A_y}\sin^2\theta) \quad (\text{Gl. 2-11})$$

Dabei entsprechen A_x und A_y den Absorptionswerten bei Polarisation parallel (x) bzw. senkrecht (y) zur Richtung der definierten Achse, hier der angelegten Kraft, und θ dem Polarisationswinkel (relativ zur x-Achse).

Der molekulare Ordnungsparameter S^{mol} beschreibt die Ausrichtung und den Grad der Orientierung einer Schwingung. Dieser wird bei zylindrischer Probengeometrie mit folgender Gleichung bestimmt:

$$S^{\text{mol}} = \frac{A_x - A_y}{A_x + 2A_y} \quad (\text{Gl. 2-12})$$

Sind alle Übergangsdipolmomente entlang der x-Achse ausgerichtet, ergibt sich daraus ein Wert $S^{\text{mol}} = 1$. Isotrope Proben hingegen sind durch einen Wert von 0 gekennzeichnet. Liegt der Wert zwischen 0 und -0,5, sind die Schwingungen senkrecht zur x-Achse ausgerichtet. Da die analysierten Filme eine abweichende Geometrie aufwiesen, sind die erhaltenen S^{mol} -Werte als Näherungen zu verstehen.

Zur Berechnung von S^{mol} sowie des Absorptionsmaximums der Bande bei etwa 964 cm^{-1} wurde eine gerade Basislinie (zwischen rechtem und linkem Peak-Minimum) abgezogen und die Absorptionsbande durch Gauss-Fits beschrieben. Dies wurde mit Hilfe eines von Dr. Perikles Papadopoulos (Institut für Experimentelle Physik, Universität Leipzig, jetzt: Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz) entwickelten Algorithmus für alle Polarisationswinkel bei den einzelnen Dehnungsschritten berechnet.

2.5.4.4 Temperaturabhängige FTIR-Messungen

Temperaturabhängige Strukturuntersuchungen der Filme wurden auf zwei Arten durchgeführt. Einerseits wurden die Proben für 20-80 min in Glaspetrischalen bei verschiedenen Temperaturen im Ofen inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten FTIR-Spektren im ATR-Modus (Bruker Tensor 27 IR-Spektrometer) aufgenommen. Andererseits wurden Filme in einer temperierbaren Kammer, welche kontinuierlich mit Stickstoff gespült wurde, direkt in dem Strahlengang des Varian FTS6000 FTIR Spektrometer platziert (durchgeführt wiederum in Kooperation mit Roxana Ene, Universität Leipzig). Die Temperatur wurde dabei in $10 \text{ }^\circ\text{C}$ Schritten bis auf $280 \text{ }^\circ\text{C}$ erhöht und anschließend wieder schrittweise auf $30 \text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Bei jedem Schritt wurden Transmissionsspektren mit einer Akkumulation von 512 Spektren und einer nominellen Auflösung von 4 cm^{-1} aufgenommen.

2.6 Mikroskopische Methoden

2.6.1 Lichtmikroskopie

Lichtmikroskopische Analyse wurde zur Überprüfung der Morphologie eukaryotischer Zellen eingesetzt (s. 2.8). Hierbei wurde ein Leica DMIL LED Mikroskop mit Phasenkontrast und Modulationskontrast verwendet, die Aufnahmen erfolgten mit einer DFC 295 Farbkamera (Leica). Des Weiteren wurde die Dicke von Filmen zur mechanischen Analyse lichtmikroskopisch bestimmt.

2.6.2 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die Rasterkraftmikroskopie (AFM) wurde verwendet, um die Oberfläche der verschiedenen Spinnenseidenfilme abzubilden. Bei dieser Methode wird die Probenoberfläche mit einer an einer Blattfeder, dem sog. Cantilever, befestigten, feinen Spitze Zeile für Zeile abgetastet. Relevant sind dabei sowohl anziehende als auch abstoßende Kräfte zwischen der Spitze und der Probe (Binnig *et al.*, 1986). Die relative Bewegung zwischen Spitze und Probe wird über Piezo-Stellelemente realisiert. Während des Scannens über die Probe wird die Auslenkung der Nadel durch die Reflexion eines Lasers detektiert und in ein Signal verwandelt. Dieses Signal wird wiederum verwendet, um den Abstand der Probenoberfläche zur Nullposition der Spitze mit Hilfe des so genannten Z-Piezokristalles zu korrigieren. Der daraus bestimmte Wert für den Z-Piezo (Höhe) kann wie die Auslenkung abgebildet werden und vermittelt so einen optischen Eindruck von der Probe.

Es gibt verschiedene Methoden die Probe abzutasten. Beim Kontakt-Modus (*contact mode*) steht die Spitze mit konstanter Kraft in ständigem Kontakt zur Probenoberfläche. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten *tapping mode* wird die Spitze an einem oszillierenden Cantilever über die Probe bewegt. Die Spitze steht hierbei nicht in ständigem Kontakt mit der Probe, was meist zu einer höheren lateralen Auflösung und weniger Beschädigung der Probe führt (García & Pérez, 2002).

Die zu untersuchenden Filme wurden aus dem jeweiligen Lösungsmittel auf Polystyrol (Petrischalen) sowie Teflon und Glas gegossen ($0,15 \text{ mg Protein/cm}^2$), bei kontrollierter Luftfeuchtigkeit von 30 % ÜN getrocknet und anschließend der jeweiligen Nachbehandlung unterzogen (ebenfalls ÜN). Die AFM-Aufnahmen erfolgten an getrockneten Filmen an Luft mit Standard-Silicon-Cantilevern bei einer Aufnahmegeschwindigkeit von 0,4-1 Hz an einem DimensionTM 3100 ausgestattet mit Nanoscope IV SPM Controller (Veeco Instrument Inc.).

Zur 3D-Darstellung der Aufnahmen sowie zur Ermittlung der mittleren Rauheit R_a und der Rautiefe wurde die Software Nanoscope 6.14r1 (*Veeco Instruments Inc.*) verwendet. Pro Film wurden mehrere Scans mit Flächen zwischen $1\ \mu\text{m}^2$ und $1600\ \mu\text{m}^2$ an 3-5 zufällig gewählten, unterschiedlichen Stellen aufgenommen. Zur Bestimmung der Rauheitswerte wurden mehrere Ausschnitte (mit 1 bzw. $25\ \mu\text{m}^2$) gemittelt. Die mittlere Rauheit R_a entspricht dabei dem arithmetischen Mittel der Abweichung jedes einzelnen Messpunktes von der Mittellinie, während die Rautiefe den maximalen Abstand zwischen höchsten und niedrigsten Punkt der untersuchten Fläche angibt.

2.6.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Zur Detektion gekoppelter Nanogold-Partikel auf Spinnenseidenfilmen wurden diese wie unter 2.4.6.2 beschrieben auf Goldnetzchen („*grids*“, 400 mesh, *Plano*) präpariert und mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) analysiert. Dabei wird die Probe von Elektronen durchstrahlt und auf einem Leuchtschirm bzw. Film abgebildet. Die Messungen erfolgten an einem 100 CX Transmissionselektronenmikroskop (*Jeol*) bei einer Anodenspannung von 100 kV und wurden freundlicherweise von Bettina Richter (AG Prof. Johannes Buchner, Lehrstuhl für Biotechnologie, TU München) durchgeführt.

2.6.4 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) kann ein plastisches Abbild einer Probenoberfläche über einen weiten Vergrößerungsbereich mit hoher Tiefenschärfe und erhalten werden. Das Messprinzip beruht auf einem fein gebündelten Elektronenstrahl, der Zeile für Zeile über die Oberfläche einer Probe geführt wird und im Hochvakuum mit dieser wechselwirkt. Dabei können verschiedene Signale mit unterschiedlichem Informationsgehalt detektiert werden. So liefern Sekundärelektronen, welche durch den auftreffenden Elektronenstrahl aus der Probenoberfläche herausgeschlagen werden, Informationen über die Topographie der untersuchten Oberfläche. Zurückgestreute Elektronen hingegen haben höhere Energie und bilden hauptsächlich Unterschiede der Materialzusammensetzung (hinsichtlich der Ordnungszahlen) ab.

Zur Analyse biologischer Proben werden diese durch Aufdampfen (*sputtern*) einer Schicht aus typischerweise Kohlenstoff, Gold oder Platin leitfähig gemacht. Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von mit Gold bedampften Spinnenseidenfilmen (gegossen auf Polystyrol) wurden am Lehrstuhl Metallische Werkstoffe der Universität Bayreuth an einem 1540EsB Cross Beam Rasterelektronenmikroskop (*Zeiss*) von Claudia Blüm sowie Hendrik

Bargel, beide Lehrstuhl Biomaterialien, Universität Bayreuth, angefertigt. Die Beschleunigungsspannung betrug typischerweise 3-5 kV bei einem Arbeitsabstand von 4-5 mm.

Um die Adhäsion und Morphologie von Zellen auf Spinnenseidenfilmen zu untersuchen, mussten die Zellen zunächst fixiert werden. Die Probenpräparation erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Rainer Detsch am Friedrich-Baur-Forschungsinstitut (FBI) für Biomaterialien der Universität Bayreuth. REM-Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. Rainer Detsch sowie Andreas Schmidt (Lehrstuhl Biomaterialien, Universität Bayreuth) angefertigt.

Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Proben zunächst in 2,5 % Glutaraldehyd-Lösung in PBS (mehrere Stunden) und anschließend für 1 h in 0,3 % Glutaraldehyd, 0,2 M Natriumcacodylat, 3% Paraformaldehyd fixiert. Nach Dehydrierung der Proben in einer aufsteigenden Aceton-Reihe (30-100 % Aceton) wurden die Proben Kritisch-Punkt-getrocknet. Hierbei wird das Aceton schonend durch überkritisches CO₂ substituiert (Bozzola & Russell, 1999). Anschließend konnten die Proben mit Kohlenstoff und Gold bedampft und rasterelektronenmikroskopisch (bei Beschleunigungsspannung zwischen 10-15 kV) untersucht werden.

2.7 Materialanalytische Methoden

2.7.1 Thermogravimetrische Analyse (TGA)

Um die thermische Beständigkeit der Spinnenseidenfilme zu untersuchen, wurden sie einer thermogravimetrischen Analyse (TGA) unterzogen. Bei dieser Methode wird als Messgröße die Masseänderung der Probe in Abhängigkeit der Temperatur und der Zeit bestimmt (Ehrenstein *et al.*, 1998). Vorgänge wie Verdampfen, Sublimation oder Zersetzung der Probe führen dabei zu einem Gewichtsverlust, wohingegen aus chemischen Reaktionen (Oxidation) oder Adsorption eine Massezunahme resultieren kann.

Die Messungen wurden am Lehrstuhl für Polymere Werkstoffe der Universität Bayreuth von Ute Kuhn an einem TGA/SDTA 861e Thermogravimeter (*Mettler Toledo*) durchgeführt. Die Messgenauigkeit der Mikrowaage liegt hier bei 1 µg. 3-5 mg des jeweiligen unter kontrollierter Luftfeuchtigkeit hergestellten Films wurden in einen Aluminiumoxid-Tiegel eingewogen und anschließend mit einer konstanten Heizrate von 10 °C/min auf 800 °C erhitzt. Um Oxidationsvorgänge zu verhindern und die Vergleichbarkeit der Messung mit DSC-Untersuchungen zu gewährleisten, wurde der Ofen mit Stickstoff gespült (50 ml/min).

Das gemessene Gewicht der Proben wurde jeweils relativ zum Ausgangsgewicht in % angegeben. Der Beginn einer Temperaturabnahme wurde durch den Schnittpunkt der jeweiligen

Tangenten bestimmt. Als Temperatur T_m einer Masseabnahme wurde diejenige Temperatur angegeben, bei der 50 % des jeweiligen Gewichtsverlusts auftreten. Die Messungen aller Filme wurden als Duplikat (teilweise als Triplikat) durchgeführt.

2.7.2 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Die dynamische Differenzkalorimetrie (*differential scanning calorimetry*, DSC) dient der Bestimmung der bei Umwandlungsprozessen freiwerdenden oder verbrauchten Energie. Gemessen wird der Wärmestrom \dot{Q} , d. h. die Wärmemenge pro Zeiteinheit und Masse, in Abhängigkeit der Temperatur und Zeit (Ehrenstein *et al.*, 1998). Hierzu werden die Probe und eine Referenz auf einer wärmeleitenden Trägerscheibe in einem Ofen erhitzt. Finden in der Probe endotherme bzw. exotherme Prozesse statt, so resultiert dies in einer Differenz der Temperatur bzw. des Wärmestroms gegenüber der Referenz.

Zu den endothermen Vorgängen zählen Schmelz- und Verdampfungsprozesse sowie Glasübergänge. Letztere erzeugen typischerweise einen endothermen Versatz in der Messkurve. Exotherme Signale hingegen werden beispielsweise durch Kristallisation oder Zersetzung hervorgerufen.

Die Messungen wurden an einem DSC/SDTA 821e System (*Mettler Toledo*), ausgestattet mit einer keramischen Sensorplatte mit 56-fachem Au-AuPd Temperaturfühler, am Lehrstuhl für Polymere Werkstoffe (Universität Bayreuth) von Ute Kuhn durchgeführt. Die Proben wurden in verschließbare Aluminium-Tiegel eingewogen (3-4 mg) und unter Stickstoffatmosphäre (20 ml/min) mit einer Rate von 5 °C/min aufgeheizt. Als Referenz diente ein entsprechender leerer Tiegel. Die Proben wurden entweder kontinuierlich von 20 °C auf 400 °C oder zyklisch erhitzt, um bestimmte Prozesse besser aufzulösen. So wurde zunächst auf 110 °C erhitzt, um freies Lösungsmittel zu verdampfen, und nach 10-minütiger Isotherme auf -40 °C gekühlt. Optional schloss sich daran ein weiterer Heizschritt bis 220 °C an, bevor nach erneutem Abkühlen der Probe auf +20 °C bis auf 400 °C geheizt wurde. Für jede untersuchte Filmvariante wurden 2-3 unabhängige Messungen durchgeführt. Zur Auswertung der erhaltenen Messkurven wurde eine Basislinie subtrahiert.

2.7.3 Zugmessung

Zur Bestimmung mechanischer Eigenschaften der Filme wurde Zugversuche durchgeführt. Die Messung erfolgte an Luft, d. h. mit trockenen Filmen, welche unter kontrollierten Bedingungen (30 % relative Luftfeuchtigkeit) hergestellt wurden, bei einer Luftfeuchtigkeit von 41 ± 1 % und 20 ± 1 °C. Die Filme wurden mit einem Skalpell oder einer scharfen Rasierklinge in Streifen von 1,5-2 mm x 20 mm geschnitten. Um Verletzungen der Probe

durch das Einspannen in die Klemmböden der Zugmaschine zu vermeiden, wurden die Filmstreifen mit Hilfe eines Zweikomponenten-Epoxy-Klebers auf Probenträger aus stabilem Papier befestigt (Abb. 2.4 a).

Die Aussparung des Probenträgers betrug 10 mm, was der Anfangsmesslänge entspricht. Für die Messung wurde der Probenhalter in den Klemmböden eines Universal Tester 5565 (*Instron*) befestigt, der Papiersteg vorsichtig durchtrennt und anschließend die Probe durch einen Motor mit einer konstanten Geschwindigkeit von 0,2 mm/min auseinander gezogen. Die dabei aufgewendete Kraft wurde mit einer Kraftmessdose mit einer Maximalbelastung von 10 N gemessen, deren Abweichung im relevanten Kraftbereich $\leq 0,2 \%$ betrug. Die gemessene Kraft wurde auf den Querschnitt der jeweiligen Probe bezogen und somit als Spannung gegen die Dehnung (Längenänderung relativ zur Anfangslänge) aufgetragen. Um die dafür benötigte Dicke der Filme zu bestimmen, wurde diese – wie auch die genaue Breite des Streifens – für jede Probe lichtmikroskopisch bestimmt. Die Dicke der Filme variierte v. a. bei Streifen, welche aus dem Randbereich des ursprünglich gegossenen Films stammten, während sie in den übrigen Streifen nur geringe Abweichung zeigte und bei dem Großteil der untersuchten Proben zwischen 10-12 μm lag.

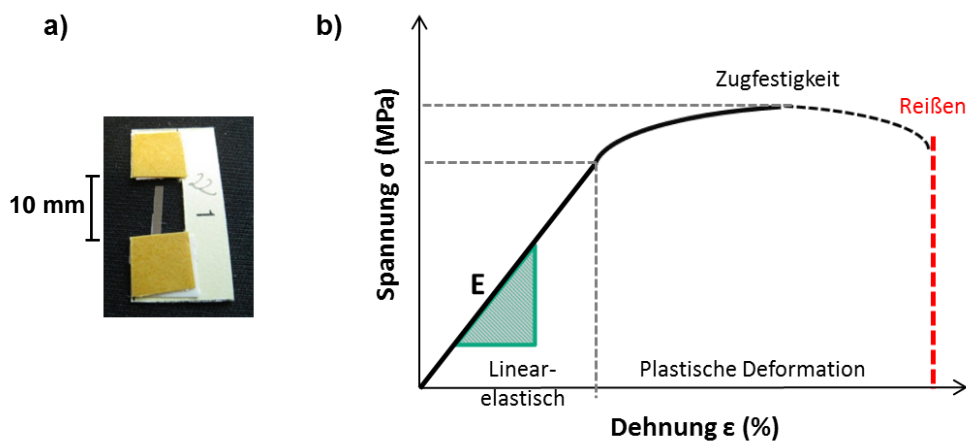


Abb. 2.4: Probenpräparation (a) und typisches Spannungs-Dehnungs-Diagramm (b) des Zugversuchs an rekombinanten Spinnenseidenfilmen. E: E-Modul (Steigung im linear-elastischen Bereich). Spannung: Kraft/Querschnittsfläche; Dehnung: Längenänderung/Anfangslänge $\times 100$

Aus den typischerweise erhaltenen Spannungs-Dehnungs-Diagrammen (Abb. 2.4 b) wurde die Zugfestigkeit, d. h. die maximal erreichte Spannung σ , sowie die Bruchdehnung ermittelt. Aus der Steigung im linear-elastischen Bereich wurde der Elastizitätsmodul $E = \Delta\sigma / \Delta\epsilon$ berechnet, welcher ein Maß für die Steifigkeit der Probe darstellt.

Filme, die bei mikroskopischer Betrachtung vor der Messung Verletzungen aufwiesen oder die während der Messung z. B. an der Klemmböde rissen, wurden aus der Auswertung ausgenommen, so dass pro Filmtyp (Lösungsmittel, Nachbehandlungsmethode) die Werte aus

8-14 Einzelmessungen gemittelt wurden. Im Fall Methanol-behandelter HFIP-Filme lag die Zahl aufgrund der hohen Brüchigkeit nur bei 5 Proben.

Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Rainer Giesa (Labor für Polymerverarbeitung, Makromolekulare Chemie I, Universität Bayreuth) durchgeführt.

2.7.4 Dynamisch mechanische Analyse (DMA)

Bei der dynamisch mechanischen Analyse (DMA) wird die Probe einer sinusförmigen dynamischen Belastung ausgesetzt, welche in Abhängigkeit der Temperatur, Frequenz und/oder der Zeit beobachtet wird (Ehrenstein *et al.*, 1998). Messgrößen sind dabei die Amplitude der aufgewendeten Kraft und der Verformung sowie die Phasenverschiebung δ beider Schwingungen (Abb. 2.5). Rein elastisches Verhalten, d. h. keine Verschiebung, tritt in der Regel bei Festkörpern auf. Ein Phasenwinkel von $\pi/2 = 90^\circ$ kennzeichnet rein viskoses Verhalten. Visko-elastische Materialien schließlich zeigen Winkel zwischen beiden Extremen.

Aus den Messungen lässt sich der komplexe Modul – bei Zugbelastung der Elastizitätsmodul – bestimmen. Er setzt sich zusammen aus dem Realteil, dem Speichermodul E' , und dem Imaginärteil, dem Verlustmodul E'' . Der Speichermodul ist ein Maß für die Steifigkeit bzw. Festigkeit des Materials und entspricht der elastisch gespeicherten Energie. Der Verlustmodul hingegen spiegelt die unwiederbringlich in anderer Form abgegebene Energie, wie z. B. Wärme oder plastische Verformung, wider. Als Maß für das Verhältnis beider Komponenten dient der Verlustfaktor $\tan \delta$. Messtechnische Voraussetzung ist dabei, dass die Probe im linear-elastischen Bereich beansprucht wird.

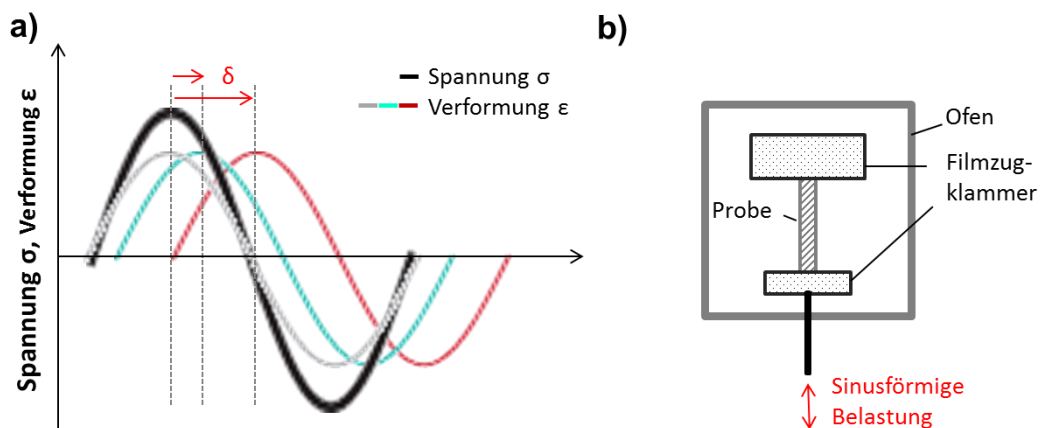


Abb. 2.5: (a) Sinusförmige Schwingung (Spannung) und Antwortsignal (Verformung) eines rein elastischen (grau), rein viskosen (rot) bzw. visko-elastischen (grün) Materials. δ : Phasenwinkel. (b) Schematischer Messaufbau der DMA. Filmstreifen wurden in eine Filmzugklammer eingespannt, wobei der untere, bewegliche Teil die Probe mit einer konstanten Amplitude bei vorgegebener Frequenz beansprucht. Der Messaufbau befindet sich in einem Ofen, die Heizrate betrug 2°C/min .

Zur Analyse wurden die Filme in Streifen mit 1-2 mm Breite geschnitten und in die Filmzug-Klammer einer DMA 2980 (*TA Instruments*) eingespannt (Abb. 2.5 b). Zunächst wurde ein Frequenzdurchlauf (*frequency sweep*) durchgeführt. Bei Frequenzen $< 0,5$ -1 Hz wurde ein Fließverhalten beobachtet, während sich ab etwa 5 Hz keine signifikanten Änderungen mehr ergaben. Dementsprechend wurden die folgenden temperaturabhängigen Messungen bei 1 und 5 Hz durchgeführt. Um die Filme zu strecken und in geringe Vorspannung zu bringen, wurde eine statische Anfangskraft von 0,5 N angelegt. Die Amplitude der Auslenkung wurde auf 0,08-0,1 % der bestimmten Anfangslänge festgesetzt. Mit Hilfe eines Ofens, welcher den Messaufbau umgab, wurde mit einer konstanten Heizrate von 2 °C/min auf 300 °C geheizt. Für alle Filme erfolgte eine Zwei-bzw. Dreifachbestimmung. Die zur Auswertung benötigte Filmdicke wurde für jeden Streifen individuell bestimmt. Die Messungen erfolgten am Lehrstuhl für Werkstoffverarbeitung der Universität Bayreuth.

2.7.5 Kontaktwinkelanalyse

Die Methode der Kontaktwinkelanalyse ermöglicht die Bestimmung der Oberflächenenergie fester Materialien. Um Aussagen über die Hydrophobizität der Filmoberflächen zu treffen, wurde in dieser Arbeit der Benetzungswinkel mit Wasser (liegender Tropfen) gemessen. Hierzu wurde am Ende einer Kanüle, welche senkrecht über der zu untersuchenden Probe angebracht war, ein Tropfen erzeugt. Die Probe wurde mit Hilfe eines Trägartisches nach oben gefahren, um den Tropfen von der Kanüle abzunehmen. Mit einer Kamera wurde das Bild des Tropfens sofort nach dessen Absetzen auf der Oberfläche festgehalten. Die Auswertung des Kontaktwinkels erfolgte nach Setzen einer Basislinie an der Grenzfläche zwischen Tropfen und Oberfläche mittels Laplace-Young-Fit.

Als Kontaktwinkel θ wird der Winkel zwischen dem Rand des Meniskus des Tropfens und der Grenzfläche fest-flüssig bezeichnet. Betrachtet wird dabei der Dreiphasenpunkt, in welchem die Phasen gas/flüssig/fest aneinandergrenzen und im Gleichgewicht stehen (Kwok & Neumann, 1999). Die Summe aller angreifenden Kräfte muss an diesem Punkt gleich Null sein und es ergibt sich die Young-Gleichung:

$$\sigma_{s,g} = \sigma_{l,s} + \sigma_{l,g} \cdot \cos \theta \quad (\text{Gl. 2-13})$$

mit $\sigma_{s,g}$: Oberflächenspannung der festen Phase
 $\sigma_{l,s}$: Oberflächenspannung der flüssigen Phase
 $\sigma_{l,g}$: Grenzflächenspannung zwischen beiden Phasen

Die Messungen erfolgten am Lehrstuhl Physikalische Chemie II der Universität Bayreuth.

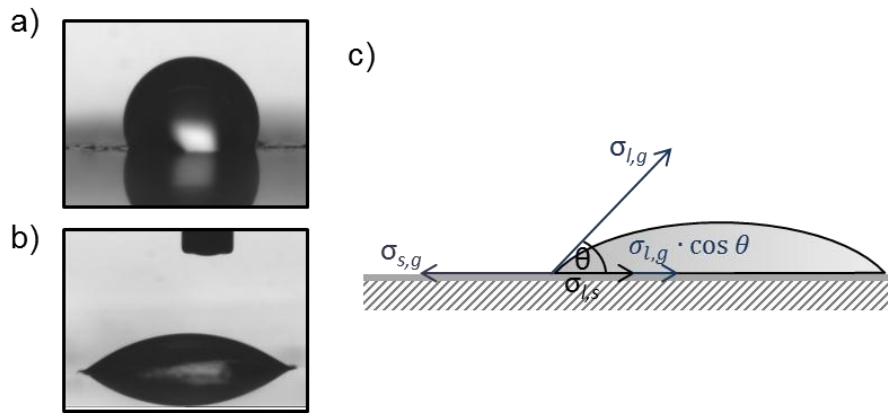


Abb. 2.6: Kontaktwinkelanalyse. Foto eines Tropfens $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$ auf einem Methanol-behandelten eADF4(C16) Film aus wässriger Lösung gegossen auf verschiedenen Substraten: (a) Glas, (b) Polystyrol. (c) Kontaktwinkel θ und zugehörige Grenzflächenspannungen (s. Gl. 2-13) nach Young (modifiziert nach Velzenberger *et al.*, 2009).

2.8 Zellkulturtechniken

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zellen der Linie MC3T3-E1 (s. 2.1.3.2) verwendet. Dabei handelt es sich um murine embryonale Zellen der Schädeldecke, welche fibroblastenartig sind, aber auch zu Osteoblasten differenzieren können. Das Wachstum erfolgt adhärent als Monolage.

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer Sicherheitswerkbank (Klasse 2, *HeraSafe KS*, *Thermo Scientific*) unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Zentrifugationsschritte wurden bei ≤ 1000 rpm und RT durchgeführt, alle verwendeten Lösungen auf 37°C vorgewärmt.

2.8.1 Auftauen, Kultivierung und Einfrieren von Zellen

Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -196°C in flüssigem Stickstoff. Aus Kultur kommend, wurden sie nach Zentrifugieren für 5 min zu einer Dichte von $1 \times 10^7/\text{ml}$ in Einfriermedium resuspendiert. Hierzu wurde dem Medium DMEM (*Dulbecco's Minimal Essential Medium*) 20 % fötales Kälberserum (FKS) sowie 10 % DMSO zugesetzt, um intrazellulärer Eiskristallbildung entgegenzuwirken. Alternativ wurde ein Fertigprodukt mit ähnlicher Zusammensetzung (*Gibco*) verwendet. Nach Überführen der resuspendierten Zellen in ein steriles Kryogefäß wurden sie ÜN in einem mit Isopropanol gefüllten Einfriergefäß bei -80°C gelagert. Der Alkohol gewährleistet dabei eine langsame Abkühlung um $1^\circ\text{C}/\text{min}$. Anschließend wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

Um bei -196°C gelagerte Zellen in Kultur zu nehmen, wurden sie im Wasserbad (bei 37°C) aufgetaut und zügig mit PBS verdünnt, um im Einfriermedium enthaltenes DMSO zu verdünnen. Nach Pelletieren durch 5-10-minütige Zentrifugation wurden die Zellen im Kulturmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausgesät (Inhalt eines 1 ml Kryogefäß pro 25 cm^2 Wachstumsfläche).

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre. Da es sich um adhärenz und in Monolage wachsende Zellen handelt, wurden sie bei Erreichen von 70-90 % Konfluenz passagiert. Nach Entfernen von Serumrückständen durch Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einer 0,05 %-igen Trypsin/EDTA-Lösung (*Invitrogen*) für 2-5 min bei 37 °C abgelöst, die Reaktion durch Zugabe von Kulturmedium (3-5-facher Überschuss) gestoppt, die Zellen nach Zentrifugation auf neue Zellkulturflaschen verteilt und mit frischem Medium aufgefüllt. Gesplittet wurde dabei im Verhältnis 1:3 bis 1:5. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot Zellen mit Trypanblau-Lösung (0,5 % in PBS) versetzt und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ausgezählt.

Kulturmedium: DMEM (*Dulbecco's Minimal Essential Medium*)
 10 % FKS (fötales Kälberserum)
 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (Endkonzentration 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin)

PBS: DPBS (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*) ohne Kalzium und Magnesium

2.8.2 Vitalitäts-Test WST (*water soluble tetrazonium*)-1

Zur Bestimmung der Vitalität der Zellen nach Aussäen und Kultivierung auf Spinnenseidenfilmen wurde der Vitalitätstest WST-1 (*Roche*) verwendet. Das Prinzip dabei ist die Umsetzung des Tetrazoniumsalzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazol-5-yl]-1,3-Benzol-Disulfonat) durch das Enzym mitochondriale Succinat-Tetrazolium Dehydrogenase zu wasserlöslichem Formazan. Dies geht mit einem Farbumschlag der Lösung einher (von rötlich nach orange), der photometrisch durch Messung der Absorption bei 450 nm quantifiziert werden kann. Da das Enzym aus der mitochondrialen Atmungskette stammt, gibt der Test Auskunft über die Mitochondrienaktivität der Zellen, was als ein Maß für deren Vitalität verwendet wird.

Die Messung erfolgte in 96-well-Zellkulturplatten. Vor der Analyse wurde das alte Medium vorsichtig abgenommen, 100 µl frisches Medium und 10 µl WST-1 Lösung zugegeben. Nach 3-4 h Inkubation bei 37 °C erfolgte die Absorptionsmessung bei 450 nm mit einem Mithras LB 940 *Platereader* (*Berthold Technologies*). Als Referenz wurde der Absorptionswert bei 630 nm abgezogen und alle Werte um die Absorption einer Negativkontrolle korrigiert, welche einen entsprechenden Film, Medium und WST-1 enthielt, jedoch keine Zellen. Alle Messungen wurden in Vierfachbestimmung durchgeführt.

2.8.2.1 Filmpräparation

Die zu untersuchenden Filme wurden direkt aus der jeweiligen Lösung (Proteinkonzentration 3 mg/ml; Filme 0,15 mg/cm²) in unbehandelte Zellkulturplatten (für Suspensionszellen,

Sarstedt, Material: Polystyrol) gegossen und nach Trocknung ÜN mit der jeweiligen Lösung nachbehandelt. Bei nachträglicher Kopplung des zyklischen RGD-Peptids c(RGDfK) wurde die Reaktion wie unter 2.4.6.2 beschrieben durchgeführt.

Vor Aussäen der Zellen wurden die Filme zweimal mit PBS und einmal mit Zellkulturmedium gewaschen, um Rückstände der Lösungsmittel zu entfernen.

2.8.2.2 Adhäsionstest

Zur Bestimmung der Zelladhäsion, welche in den ersten Stunden nach Aussäen stattfindet, wurden 4×10^4 Zellen pro *well* in 96-*well* Zellkulturplatten mit dem jeweiligen Film gegeben. Da im Serum enthaltene Komponenten die Adhäsion beeinflussen und so die Aussage über die direkte Interaktion der Zellen mit den Seidenfilmen verfälschen können, wurde der Test in Medium mit bzw. ohne Zusatz von FKS durchgeführt. In diesem Fall wurde dem Medium 1 % HSA (humanes Serumalbumin) zugesetzt. Die Anzahl der fest adhärenierten Zellen wurde nach vierstündiger Inkubation bei 37 °C bestimmt. Hierzu wurde der Überstand abgenommen und zweimal mit PBS (je 200 µl) gewaschen, um lose Zellen zu entfernen. Anschließend wurden 100 µl frisches Medium zugesetzt und der Vitalitätstest WST-1 durchgeführt.

2.8.2.3 Proliferationstest

Die Proliferation der Zellen auf verschiedenen Filmen wurde über mehrere Tage verfolgt. Die Anfangszellzahl betrug 5×10^3 Zellen pro *well*. Nach jeweils 48 h wurde das Medium gewechselt, wobei aufgrund der langen Inkubationsdauer nur das unter 2.8.1 angegebene Zellkulturmedium mit FKS verwendet wurde. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurde die Zellvitalität mittels WST-1 Assay bestimmt.

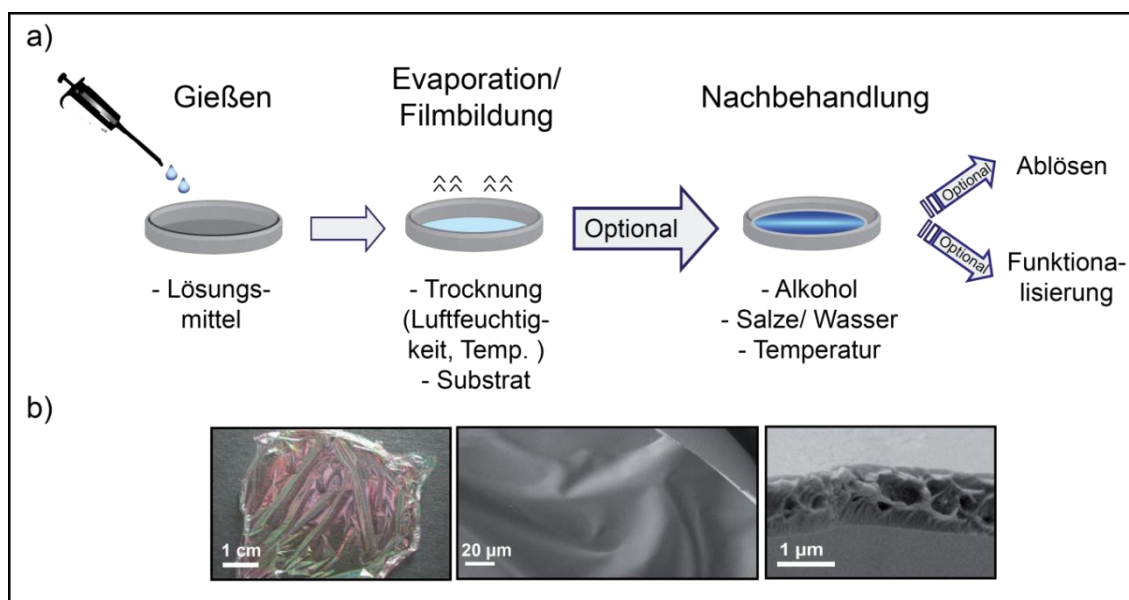
Als Kontrollen für den Adhäsions- sowie Proliferationstest dienten unbeschichtete Zellkulturplatten in welche die Filme gegossen wurden (s. o.) als Negativkontrolle sowie für gute Zelladhäsion optimierte Zellkulturplatten (NunclonTM, *Nunc*) als Positivkontrolle.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von eADF4(C16) Filmen

Um Spinnenseidenfilme als Materialien für konkrete Anwendungen einsetzen zu können, ist zunächst ihre Charakterisierung notwendig. Für Seidenfolien aus Fibroin, dem Seidenprotein des Maulbeerspinner *Bombyx mori*, wurde bereits beschrieben, dass verschiedene Parameter bei der Filmherstellung die Eigenschaften des daraus resultierenden Films beeinflussen können (Murphy & Kaplan, 2009; Jin *et al.*, 2005; Lawrence *et al.*, 2010; Lu, 2009; Hardy *et al.*, 2008; Vasconcelos *et al.*, 2008).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Filme aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) wurden durch Gießen einer Proteinlösung auf unterschiedliche Substrate hergestellt. Durch Abdampfen des Lösungsmittels entsteht dabei ein in sich stabiler, transparenter und (abhängig von der Dicke) selbsttragender Film, der bei Bedarf vom jeweiligen Substrat abgezogen werden kann. Die Dicke des entstehenden Films kann dabei über die verwendete Proteinkonzentration bzw. die Proteinmenge pro Fläche eingestellt werden. Optional kann der Film einer nachfolgenden Behandlung unterzogen werden sowie mit weiteren Molekülen funktionalisiert werden, um bestimmte Eigenschaften anzupassen oder neue zu erzeugen (Schema 3.1).



Schema 3.1: (a) Herstellung rekombinanter Spinnenseidenfilme. Das gelöste Protein eADF4(C16) wurde auf ein Substrat (standardmäßig Polystyrol-Petrischalen) gegossen. Nach Abdampfen des Lösungsmittels bleibt ein Proteinfilm zurück, der optional nachbehandelt und/oder mit externen Effektormolekülen weiter funktionalisiert und schließlich abgezogen werden kann. Angegeben sind die bei dem jeweiligen Schritt untersuchten Parameter. (b) Photographie (links) bzw. rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Mitte und rechts) von eADF4(C16) Filmen.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des verwendeten Lösungsmittels, eines Umgebungsparameters (Luftfeuchtigkeit), sowie verschiedener Nachbehandlungsmethoden (Methanol, Ethanol, Kaliumphosphat und Temperatur) auf verschiedene Eigenschaften der jeweiligen Filme untersucht. Analysiert wurde die Auswirkung auf die Sekundärstruktur der Proteine sowie auf die thermische, chemische und mechanische Stabilität der Filme. Ein weiteres Augenmerk lag auf der Oberflächenbeschaffenheit der Filme. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Filme in Petrischalen (Polystyrol) gegossen. Auf Beschichtung anderer Substrate wird zudem in Kapitel 3.3 eingegangen.

3.1.1 Analyse der Sekundärstruktur

Viele makroskopische Materialeigenschaften wie z. B. die chemische und thermische Stabilität sowie mechanische Kenngrößen lassen sich auf die intrinsischen Eigenschaften der Komponenten sowie auf die Verknüpfung und Interaktion der einzelnen Moleküle zurückführen. Im Falle von aus Proteinen bestehenden Materialien entspricht dies der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine bzw. ihrer hierarchischen Anordnung. Im Folgenden wird daher zunächst der Einfluss verschiedener Prozessparameter (Lösungsmittel, Nachbehandlungsmethode und Luftfeuchtigkeit) auf die Sekundärstruktur der Proteine im Film untersucht.

3.1.1.1 Einfluss verschiedener Lösungsmittel

Als Lösungsmittel zur Herstellung von Filmen aus Seidenproteinen haben sich Hexafluoroisopropanol (HFIP), Ameisensäure (AS), Trifluoressigsäure sowie Wasser etabliert (Vasconcelos *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2003; Ha *et al.*, 2005; Um *et al.*, 2003). Letzteres ist besonders im Hinblick auf mögliche Anwendungen im biomedizinischen Bereich und zur Vermeidung von schädlichen Lösungsmitteln bei der Prozessführung von Interesse. In dieser Arbeit wurden als Lösungsmittel HFIP, Ameisensäure sowie wässrige Pufferlösung (wL) verwendet. Während das Protein eADF4(C16) direkt in den organischen Lösungsmitteln gelöst werden kann, ist es in wässrigen Systemen größtenteils unlöslich und wurde zunächst in 6 M Guanidiniumthiocyanat (GdmSCN) gelöst und anschließend gegen den gewünschten Puffer dialysiert. Als Puffersystem kamen 10 mM Tris-HCl (pH 8) und 5 mM NH_4HCO_3 (pH 8) zum Einsatz.

Obwohl die Sekundärstruktur von Proteinen hauptsächlich durch ihre Primärstruktur vorgegeben ist (Anfinsen, 1973; Anfinsen *et al.*, 1961), können sie in Wechselwirkung mit Lösungsmitteln unterschiedliche Konformationen annehmen. Die verschiedenen Proteinlösungen wurden mittels CD-Spektroskopie im Fern-UV Bereich untersucht. In Pufferlösung

(wL) zeigt eADF4(C16) CD-Spektren mit einem starken Minimum unterhalb von 200 nm, was typischerweise auf unstrukturierte Proteine bzw. Polyprolin II-Helices hindeutet (Abb. 3.1) (Chen *et al.*, 2005; Rath *et al.*, 2005). Die Messkurve nimmt jedoch bereits ab 230 nm negative Elliptizitätswerte an, was auf einen gewissen Anteil an α -Helices und β -Faltblatt-Struktur hindeutet. Die Spektren des Proteins in beiden verwendeten Puffersystemen gleichen sich und entsprechen dem in 5 mM Natriumphosphat (pH 8) (Huemmerich *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu weist das CD-Spektrum des in HFIP gelösten Proteins einen deutlich höheren Anteil an α -Helices auf, worauf die stärker ausgeprägte Schulter um 220 nm hinweist (Abb. 3.1). Die Sekundärstruktur in Ameisensäure konnte aufgrund der starken Eigenabsorption des Lösungsmittels nicht ermittelt werden.

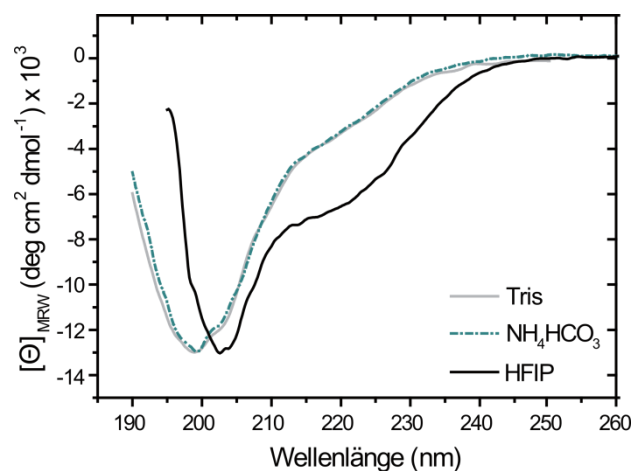


Abb. 3.1: Fern-UV CD-Spektren von eADF4(C16) in 10 mM Tris-HCl (pH 8), 5 mM NH_4HCO_3 (pH 8) oder HFIP. Die Proteinkonzentration betrug 3 μM .

Da keine Unterschiede der getesteten Puffersysteme auf die Sekundärstruktur von eADF4(C16) in Lösung beobachtet wurden und auch erste Untersuchungen an Filmen keine Auffälligkeiten zeigten, wurde im Folgenden Ammoniumhydrogencarbonat als Puffersystem verwendet. Im Vergleich zu Tris-Puffer bietet es den Vorteil eines flüchtigen Systems, so dass beim Eintrocknen der Lösung keine (sichtbaren) Salzkristalle zurückbleiben.

Die Analyse der Sekundärstruktur von rekombinanten Spinnenseidenfilmen erfolgte mittels Fourier-transformierter Infrarotspektroskopie (FTIR). Zur Bestimmung der Sekundärstruktur werden meist die Amid I- und II-Banden herangezogen, da hier für verschiedene Sekundärstrukturen sensitive Schwingungen der Peptidbindung des Proteinrückgrats auftreten. So wird die Amid I-Bande (bei $1600\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$) zu 80 % durch Streckschwingungen der Carbonylgruppe (C=O) hervorgerufen. Die Amid II-Bande ($1500\text{-}1580 \text{ cm}^{-1}$) hingegen repräsentiert Biege- sowie Streckschwingungen von N-H bzw. N-C_α Bindungen (Hu *et al.*, 2006; Barth, 2007; Rabotyagova *et al.*, 2010).

Zur Analyse wurde die Proteinlösung aus den verschiedenen Lösungsmitteln auf Petrischalen gegossen, die Filme nach vollständiger Trocknung vom Untergrund abgezogen und auf dem Germanium-Kristall des FTIR-Spektrometers im ATR-Modus (*attenuated total reflection*) gemessen. Abb. 3.2 a zeigt die erhaltenen Spektren im Bereich der Amid I- und Amid II-Bande. Die Absorptionsmaxima liegen bei Filmen aus HFIP bei 1654 cm^{-1} und 1548 cm^{-1} , was auf einen hohen Anteil an α -Helices und unstrukturierte Bereiche im Protein hinweist (Slotta *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2006). Ameisensäure-Filme hingegen erzeugen ein zusätzliches Maximum im für β -Faltblatt-Strukturen charakteristischen Bereich bei 1627 cm^{-1} bzw. 1520 cm^{-1} .

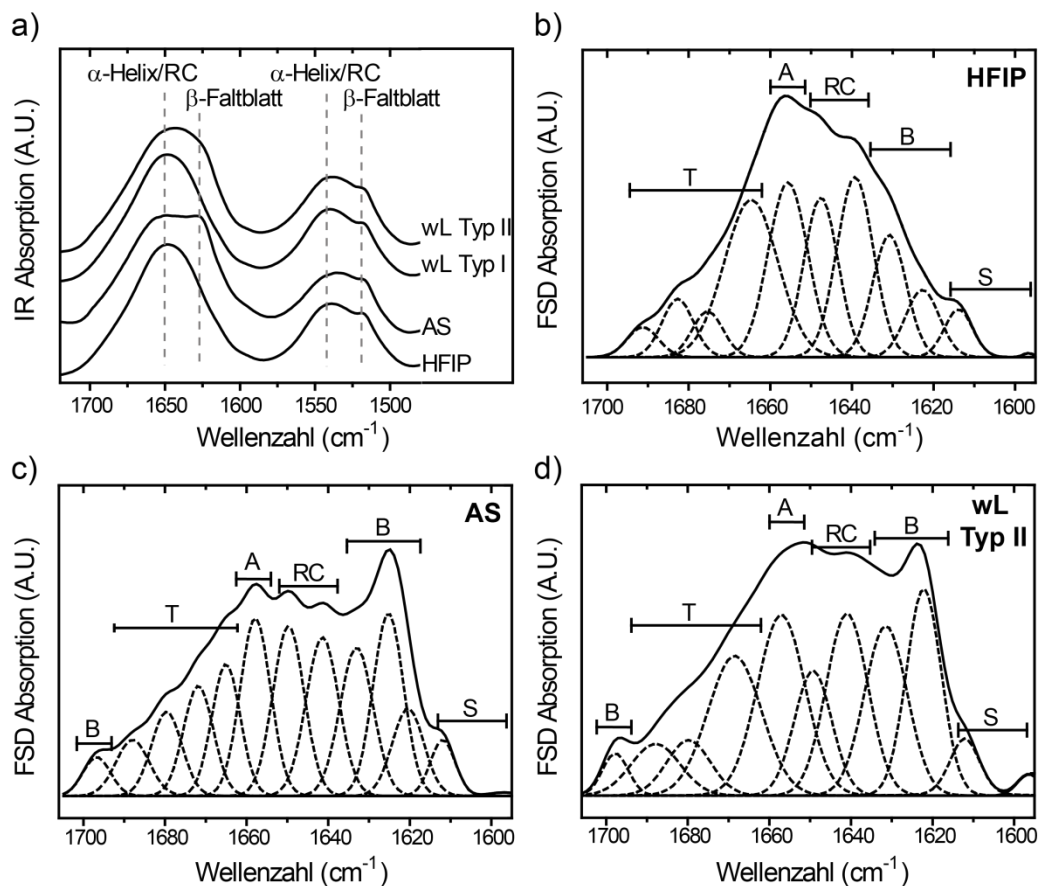


Abb. 3.2: Einfluss verschiedener Lösungsmittel (HFIP, Ameisensäure (AS) und Pufferlösung (wL)) auf die Sekundärstruktur von eADF4(C16) Filmen. (a) FTIR-Spektren im Bereich der Amid I ($1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$) und Amid II ($1500\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$) Bande. (b-d) Dekonvolution der Amid I-Bande der in (a) gezeigten Spektren: (b) HFIP, (c) AS, (d) wL Typ II. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug 10 mg/mL in den organischen Lösungsmitteln und 3 mg/mL in Puffer. Eine prozentuale Auswertung ist in Tabelle 3.1 zusammengefasst. (A.U.: willkürliche Einheiten; T: β -turns, B: β -Faltblatt, A: α -Helix, RC: random coil, S: sonstige; wL Typ I und II: entsprechen unterschiedlichen Bereichen innerhalb eines wL-Filmes, s. Text). (nach Spiess *et al.*, 2011 mit freundlicher Genehmigung des Verlags Royal Society of Chemistry)

Für Filme aus wässriger Pufferlösung wurden unterschiedliche Spektren erhalten, je nach untersuchter Region eines Filmes. Sie lassen sich in zwei „Typen“ untergliedern, wobei die Absorption der Amid I-Bande entweder dem in HFIP Filmen gleicht (mit einem Maximum bei etwa 1654 cm^{-1}) – im Folgenden als Typ I bezeichnet – oder in Richtung niedrigerer

Wellenzahlen verbreitert ist (Typ II). Solch strukturelle Inhomogenität wurde ausschließlich bei diesen Filmen beobachtet, nicht jedoch bei Filmen aus den organischen Lösungsmitteln. Möglicherweise treten durch das im Vergleich zu HFIP und Ameisensäure wesentlich langsamere Abdampfen des Wassers Trocknungsartefakte auf, welche regionale Unterschiede in der Proteinkonzentration erzeugen und so vermutlich zur Ausbildung lokal unterschiedlicher Sekundärstrukturverteilung führen.

Die Amid I-Bande spiegelt die Summe sich überlagernder Kurven verschiedener Sekundärstruktur-Elemente wider. Zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Anteile wurde daher die Methode der Fourier-Selbstdekonvolution (FSD) eingesetzt (s. Kapitel 2.5.4.1). Nach anschließender Auflösung der Amid I-Bande mit Hilfe von Gauss-Oszillatoren (Abb. 3.2 b-d) lässt sich aus den normalisierten Integralen der prozentuale Anteil einer spezifischen Sekundärstruktur an der Gesamtstruktur berechnen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Grundsätzlich bestätigen sie die aus der qualitativen Analyse der Spektren getroffenen Aussagen. Alle Filme zeigen ähnliche Anteile an *random coil* und β -turn Konformation, wohingegen sie sich in ihrem Gehalt an α -Helices und β -Faltblättern unterscheiden. Filme aus HFIP besitzen mit 19 % bzw. 21 % den höchsten Anteil α -helikaler und den niedrigsten Anteil an β -Faltblatt-Struktur. Mit 30-32 % enthalten AS- und Typ II Puffer-Filme den höchsten Anteil an β -Faltblättern, während ein Anteil an α -Helices von 11-13 % berechnet wurde. Typ I wL-Filme unterscheiden sich von Typ II Filmen hauptsächlich durch ihren niedrigeren β -Faltblatt Anteil, der bei etwa 25 % liegt.

Tabelle 3.1: Sekundärstrukturanteile von eADF4(C16) Filmen gegossen aus verschiedenen Lösungsmitteln. Die prozentualen Anteile wurden über FSD bestimmt (s. Abb. 3.2 und Kapitel 2.5.4.1). Die angegebenen Werte wurden jeweils aus mindestens drei FTIR-Spektren gemittelt.

Sekundärstruktur	HFIP	Ameisensäure	wäss. Lösung	
			Typ I	Typ II
β-Faltblatt [%] (1616-1637 cm^{-1} und 1697-1703 cm^{-1})	21,1 \pm 2%	31,7 \pm 1%	25,3 \pm 3%	30,2 \pm 2%
α-Helix [%] (1653-1662 cm^{-1})	18,7 \pm 2%	11,5 \pm 2%	14,0 \pm 3%	13,7 \pm 2%
random coil [%] (1637-1652 cm^{-1})	27,7 \pm 1%	24,7 \pm 2%	27,5 \pm 3%	26,8 \pm 2%
β-turns [%] (1663-1696 cm^{-1})	27,8 \pm 2%	26,9 \pm 1%	28,0 \pm 2%	24,4 \pm 2%
andere [%] (1595-1615 cm^{-1})	4,2 \pm 2%	4,2 \pm 1%	4,7 \pm 2%	4,3 \pm 2%

Nachweis von β -Polyalanin

Neben Aussagen über die Sekundärstruktur in Proteinen enthält ein FTIR-Spektrum auch Informationen über spezifische Aminosäureseitenketten. So können in der sogenannten *fingerprint* Region (ca. 800-1200 cm^{-1} , Abb. 3.3) spezifische Absorptionsbanden einzelnen Polyaminosäuren oder Polydipeptiden zugeordnet werden (Papadopoulos *et al.*, 2007). Eine strukturelle Besonderheit von Spinnenseidenproteinen ist das Bilden regelmäßiger β -Faltblatt-Strukturen aus Polyalanin-Sequenzen. Eine charakteristische Absorptionsbande bei ca. 964 cm^{-1} konnte spezifisch der N-C $_{\alpha}$ Streckschwingung der Alanine innerhalb solcher Strukturen (im Folgenden β -Polyalanin genannt) zugeordnet werden (Papadopoulos *et al.*, 2007). In den Filmen mit höherem β -Faltblatt-Anteil, gegossen aus Puffer (wL Typ II) oder AS, ist diese spezifische Bande im FTIR-Spektrum deutlich zu erkennen (Abb. 3.3 b). Hingegen zeigen Typ I-Puffer-Filme sowie aus HFIP gegossene hier keine oder nur minimale Absorption.

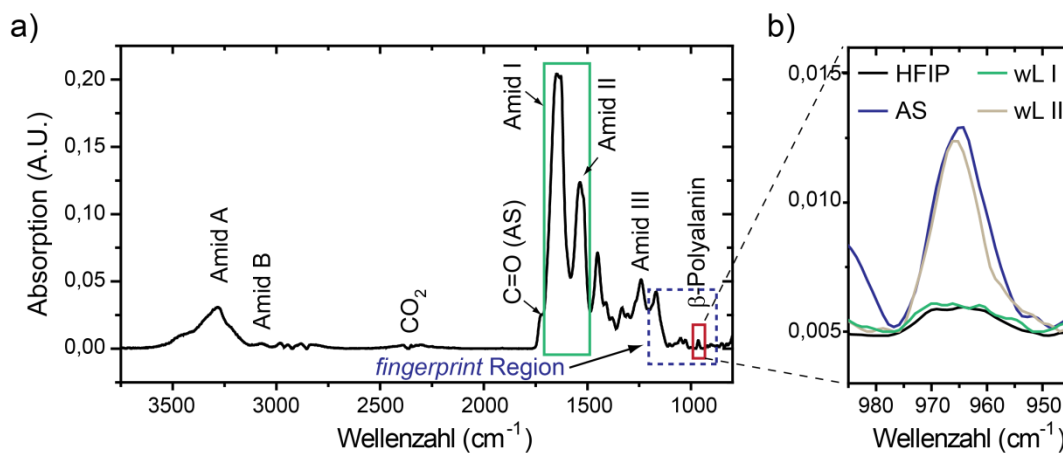


Abb. 3.3: (a) FTIR-Spektrum eines eADF4(C16)-Films aus Ameisensäure (AS) mit Zuordnung charakteristischer Banden. Hervorgehoben sind die Amid I und II Bande, sowie der *fingerprint* Bereich. Die Absorptionsbande bei 964 cm^{-1} kann spezifisch Polyalanin in β -Faltblattstruktur zugeordnet werden (β -Polyalanin). (b) Fokus auf den Wellenzahlenbereich von 940-990 cm^{-1} in IR-Spektren von eADF4(C16)-Filmen gegossen aus verschiedenen Lösungsmitteln. Die Spektren wurden hierfür über den Amid I- und II-Bereich vektornormalisiert.

3.1.1.2 Einfluss verschiedener Nachbehandlungsmethoden

Neben dem verwendeten Lösungsmittel wurde der Einfluss verschiedener Nachbehandlungsmethoden auf die Sekundärstruktur der Proteine im Film untersucht. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass reines Methanol (Methanol abs.) sowie Kaliumphosphat die Struktur von Seidenproteinen in HFIP-Filmen hin zu einem hohen Anteil an β -Faltblättern ändert (Huemmerich *et al.*, 2006; Slotta *et al.*, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben Methanol abs. und Kaliumphosphat-Lösung (1 M) auch die Wirkung von Ethanol abs. und 70 %-iger Methanol- und Ethanol-Lösungen untersucht.

FTIR-spektroskopische Analysen zeigen bei allen Nachbehandlungsmethoden eine Zunahme an β -Faltblatt-Struktur. Dies ist durch eine Verschiebung des Peakmaximums der Amid I-Bande zu $\sim 1625 \text{ cm}^{-1}$ gekennzeichnet (Abb. 3.4 a) und besonders deutlich in den jeweiligen Differenzspektren der Amid I-Bande (relativ zum jeweils unbehandelten Film) zu sehen (Abb. 3.4 b). Unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel und der Nachbehandlungsmethode zeigen die Spektren behandelter Filme eine starke Abnahme des Signals bei 1657 cm^{-1} (spezifisch für α -helikale und ungeordnete Strukturen) und eine Zunahme der Absorption um 1625 cm^{-1} (β -Faltblatt) gegenüber dem Spektrum des jeweiligen Films vor Behandlung. Besonders ausgeprägt ist diese Zunahme bei HFIP-Filmen, die vor Behandlung den niedrigsten Anteil an β -Faltblättern besitzen.

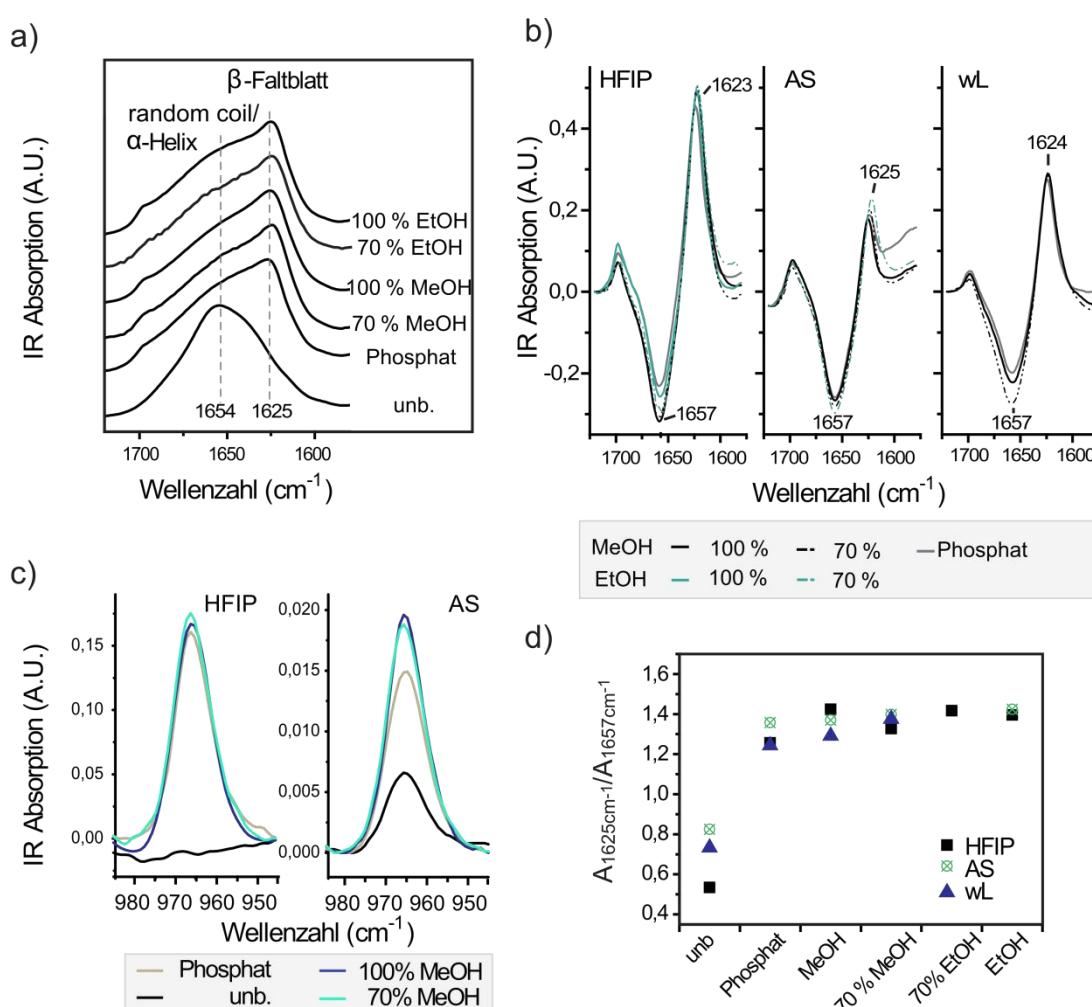


Abb. 3.4: Einfluss verschiedener Nachbehandlungsmethoden auf die Sekundärstruktur der Proteine in eADF4(C16) Filmen aus verschiedenen Lösungsmitteln. Die Filme wurden \ddot{U} N in den angegebenen Lösungen inkubiert und nach Trocknung (bei 30 % LF) mittels FTIR-Spektroskopie analysiert. (a) Spektren von HFIP-Filmen im Bereich der Amid I-Bande. (b) Differenzspektren der jeweiligen nachbehandelten Filme, erhalten durch Subtraktion des Spektrums des jeweiligen Films vor Behandlung. (c) Zunahme der für β -Polyalanin spezifischen Absorptionsbande, exemplarisch gezeigt für Filme aus HFIP und Ameisensäure (AS). (d) Quotient der Absorptionswerte bei 1625 cm^{-1} und 1657 cm^{-1} .

Betrachtet man das Verhältnis der Absorptionswerte bei 1625 cm^{-1} und 1657 cm^{-1} , so ergeben sich für die unterschiedlich nachbehandelten Filme aus allen zum Gießen verwendeten Lösungsmitteln ähnliche Werte (Abb. 3.4 d). Da dies den tatsächlichen Kurvenverlauf der Amid I-Bande gut widerspiegelt, wird dieser Quotient im Folgenden als qualitativer Indikator für die Verschiebung von α -helikaler zu β -Faltblatt-Struktur verwendet, wobei höhere Quotienten einem höheren β -Faltblatt-Anteil entsprechen.

Da nur minimale Unterschiede zwischen den verschiedenen Nachbehandlungsarten auftraten, sind die Ergebnisse der mittels FSD analysierten Verteilung von Sekundärstruktur-Elementen in Tabelle 3.2 stellvertretend für mit reinem Methanol nachbehandelte Filme zusammengefasst. Hier bestätigt sich, dass Filme gegossen aus den verschiedenen Lösungsmitteln keine signifikanten Unterschiede aufweisen. Trotz unterschiedlicher Zusammensetzung in den unbehandelten Filmen nimmt der β -Faltblatt-Anteil der Proteine in allen Filmen nach Behandlung auf etwa 42 % zu. Dies geht mit einer Abnahme von *random coil* und β -turn-Strukturen einher. Der Anteil an α -Helices verringert sich in Ameisensäure- und Puffer-Filmen leicht, in HFIP-Filmen dagegen mit 10 % am stärksten. Typ I Puffer-Filme stellen eine Ausnahme dar, mit einem geringeren Anteil an β -Faltblatt-Struktur (37 %) und der größten verbleibenden Fraktion an α -Helices.

Bei allen Filmen nimmt unabhängig von dem ursprünglichen Lösungsmittel und der Nachbehandlungsmethode mit steigendem β -Faltblatt Gehalt der für β -Polyalanin spezifische Peak zu bzw. wird im Fall von HFIP-Filmen induziert (Abb. 3.4 c). Die relative Peakhöhe der individuellen Nachbehandlungen weisen leichte Schwankungen auf. Da die Werte jedoch bei wiederholten Messungen ebenfalls leicht schwanken, spiegelt dies vermutlich experimentelle Variationen wider.

Tabelle 3.2: Sekundärstrukturanteile in mit Methanol abs. behandelten, aus verschiedenen Lösungsmitteln gegossenen eADF4(C16) Filmen. Die prozentualen Anteile wurden durch FSD bestimmt (s. 2.5.4.1). Die angegebenen Werte wurden jeweils aus mindestens drei FTIR-Spektren gemittelt.

Sekundärstruktur	HFIP	Ameisensäure	wäss. Lösung	
			Typ I	Typ II
β-Faltblatt [%] (1616-1637 cm^{-1} und 1697-1703 cm^{-1})	42,3 \pm 2%	42,5 \pm 2%	37,0 \pm 3%	42,0 \pm 2%
α-Helix [%] (1653-1662 cm^{-1})	7,7 \pm 1%	9,4 \pm 2%	12,1 \pm 2%	8,4 \pm 2%
random coil [%] (1637-1652 cm^{-1})	17 \pm 2%	21,1 \pm 2%	21,4 \pm 3%	23,6 \pm 3%
β-turns [%] (1663-1696 cm^{-1})	21,9 \pm 2%	22,0 \pm 1%	23,3 \pm 3%	22,0 \pm 2%
andere [%] (1595-1615 cm^{-1})	4,7 \pm 2%	4,6 \pm 2%	4,7 \pm 2%	4,8 \pm 2%

Die Zunahme der β -Faltblatt-Struktur korreliert dabei mit der Stabilität der Filme gegenüber Wasser und Denaturierungsmitteln. Während HFIP-Filme ohne Nachbehandlung wasserlöslich sind, sind alle nachbehandelten Filme beständig (> 24 h) gegenüber Wasser, 8 M Harnstoff und 6 M GdmHCl und lösen sich nur noch in 6 M GdmSCN (Tabelle 3.3). Ameisensäure-Filme mit einem mittleren β -Faltblatt Anteil hingegen sind unlöslich in Wasser und 8 M Harnstoff, jedoch löslich in 6 M GdmHCl. Unbehandelte Filme aus Pufferlösung zeigten kein eindeutiges Ergebnis, was vermutlich auf die heterogene strukturelle Zusammensetzung zurückzuführen ist.

Tabelle 3.3: Löslichkeit von aus verschiedenen Lösungsmitteln gegossenen eADF4(C16) Filmen vor und nach Behandlung mit Methanol abs. Die Filme wurden in das jeweiligen Denaturierungsmittel bzw. Wasser überführt und nach 24 h Inkubation makroskopisch beurteilt sowie der Überstand UV-spektroskopisch untersucht, um gelöstes Protein nachzuweisen. +: löslich, -: unlöslich, n. b.: die Werte konnten nicht bestimmt werden, unb.: unbehandelt

Inkubation in	HFIP		AS		wäss. Lösung	
	unb.	Methanol	unb.	Methanol	unb.	Methanol
Wasser	+	-	-	-	n.b	-
8 M Urea	+	-	-	-	n.b	-
6 M GdmHCl	+	-	+	-	n.b	-
6 M GdmSCN	+	+	+	+	+	+

3.1.1.3 Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit

Bei der Filmherstellung können auch Umgebungsparameter wie Temperatur, Druck oder Luftfeuchtigkeit eine Rolle bei der Ausbildung von Sekundärstruktur spielen, sei es durch Beeinflussung der Abdampf- und Trocknungsgeschwindigkeit oder durch die Menge an vorhandenem Wasser als potentielltem Interaktionspartner. Um den Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit (LF) zu untersuchen, erfolgte die Herstellung/Trocknung und Lagerung der Filme in einer Kammer mit kontrollierbarem Feuchtigkeitsgehalt bei 30 %, 50 % sowie 75 % LF.

Wassergehalt

Zunächst wurde überprüft, wie viel Wasser die unterschiedlichen Filme enthalten. Dazu wurden die Proben (je ca. 10 mg) in einem Ofen auf 140 °C erhitzt und das dabei austretende Wasser mittels Karl-Fischer-Titration quantifiziert. Tabelle 3.4 gibt einen Überblick über die erhaltenen Werte (wobei es sich meist nur um Einfachbestimmungen handelt). Es wurden jeweils aus HFIP, Ameisensäure oder wL gegossene Filme in unbehandelter sowie nachbehandelter Form getestet. Stellvertretend wurde als Nachbehandlungsmethode Methanol abs. sowie im Fall von HFIP-Filmen zusätzlich Kaliumphosphat-Lösung gewählt.

Tabelle 3.4: Wassergehalt von eADF4(C16) Filmen, die bei verschiedener relativer Luftfeuchtigkeit (LF) hergestellt und gelagert wurden. Unbehandelte (unb.) sowie mit Methanol abs. oder Kaliumphosphat nachbehandelte Filme wurden auf 140 °C erhitzt und ihr Wassergehalt (angegeben in % (w/w)) mittels Karl-Fischer-Titration bestimmt. (n. b.: die Werte wurden nicht bestimmt) Die Werte repräsentieren größtenteils Einfachbestimmungen.

LF [%]	HFIP			AS		wäss. Lösung	
	unb.	Methanol	Phosphat	unb.	Methanol	unb.	Methanol
30	4,6	8,5	8,3	6,1	7,3	8,4	8,3
50	7,9	9,8	11,5	n.b.	n.b.	10,3	n.b.
75	10,8	9,7	12,7	9,1	9,8	10,2	n.b.

Mit einem prozentualen Anteil von 4,6 % bzw. 6,1 % bei 30 % LF weisen unbehandelte Filme aus organischen Lösungsmitteln den niedrigsten Wassergehalt auf, während der Vergleichswert von wL-Filmen bei 8,4 % liegt. Durch Nachbehandlung mit Methanol erhöht sich der Wassergehalt, was möglicherweise auf eine Verdrängung des organischen Lösungsmittels sowie im Methanol enthaltenes Wasser zurückzuführen ist (es wurde kein getrocknetes Methanol verwendet). Der Wassergehalt erreicht bei allen Methanol-behandelten Filmen Werte, die im Bereich des unbehandelten Filmes aus wässriger Lösung liegen. Mit steigender LF steigt auch der Gehalt an Wasser von 8,3-8,5 % bei 30 % LF auf 10-12 % bei 75 % LF. HFIP-Filme wurden zudem nach Kaliumphosphat-Behandlung untersucht. Dies ergab in Abhängigkeit von der LF ähnliche oder etwas erhöhte Werte im Vergleich zu Methanol-behandelten Filmen.

Sekundärstruktur

Des Weiteren wurden die entsprechenden Filme mittels FTIR-Spektroskopie untersucht. Während die Luftfeuchtigkeit nur einen geringen Einfluss auf die Sekundärstruktur in Filmen aus HFIP zu haben scheint, weisen Filme aus Ameisensäure und Puffer (wL) eine deutliche Abhängigkeit auf. Mit steigender LF steigt dabei der Anteil an β -Faltblatt-Struktur, zu sehen an der deutlichen Verschiebung des Maximums von $>1650\text{ cm}^{-1}$ zu 1625 cm^{-1} (Abb. 3.5 a). Als Vergleich ist zudem das entsprechende Spektrum nach Methanol-Behandlung gezeigt. Differenzspektren von Ameisensäure- und wL-Filmen zeigen dabei eine Zunahme der Absorption bei 1625 cm^{-1} (β -Faltblatt-Struktur) sowie eine deutliche Abnahme bei 1657 cm^{-1} (α -Helices/ungeordnet) im Vergleich zu den bei LF 30 % gegossenen Filmen (Abb. 3.5 b). Der Effekt nimmt dabei mit steigender LF zu, bei 75 % LF unterscheiden sich die Spektren dieser Filme kaum von mit Methanol nachbehandelten. Im Gegensatz dazu tritt bei HFIP-Filmen mit zunehmender LF lediglich eine leichte Verschiebung des Maximums hin zu $\sim 1637\text{ cm}^{-1}$ auf. Entsprechend zeigt das Verhältnis der Absorptionswerte bei 1625 cm^{-1} und

1657 cm^{-1} hier nur eine leichte Zunahme, während bei Filmen aus Ameisensäure und wL ein deutlicher Anstieg zu erkennen ist (Abb. 3.5 c).

Ein ähnliches Muster ist bei der für β -Polyalanin spezifischen Absorption um 965 cm^{-1} zu sehen. Mit zunehmendem Anteil an β -Faltblättern steigt diese an, während in HFIP-Filmen durch erhöhte LF im Gegensatz zu Alkoholen keine Induktion dieser speziellen β -Faltblatt-Struktur zu sehen ist (Abb. 3.5 c).

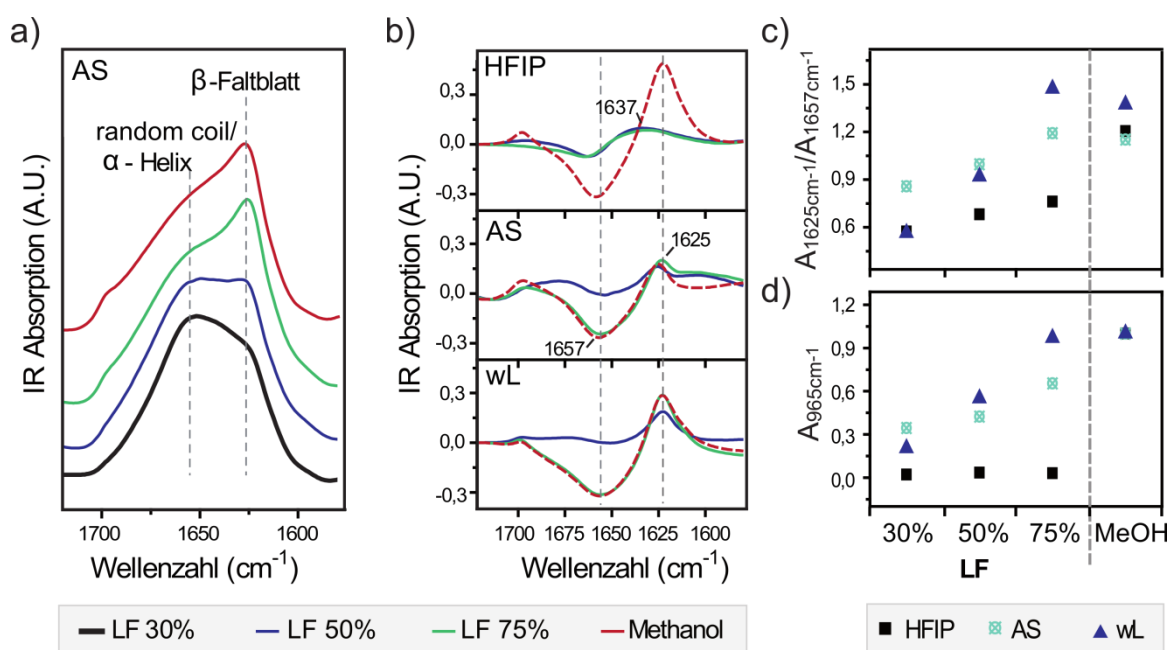


Abb. 3.5: Einfluss der Luftfeuchtigkeit (LF) auf die Sekundärstruktur von eADF4(C16) Filmen. Die Filme wurden bei der jeweils angegebenen LF gegossen, getrocknet und bis zur Analyse mittels FTIR-Spektroskopie gelagert. (a) Amid I Bande der jeweiligen Filme gegossen aus AS. (b) Differenzspektren im Vergleich zu bei LF 30 % gegessenen Filmen. (c) Quotient der Absorption bei 1625 cm^{-1} und 1657 cm^{-1} (oben) und Zunahme der für β -Polyalanin spezifischen Absorptionsbande (unten). Zur Auswertung der β -Polyalanin-Bande wurden die Spektren vektornormiert und die erhaltenen Absorptionswerte bei 965 cm^{-1} anschließend auf den Wert des jeweiligen Methanol abs.-behandelten Films normiert.

Da sich die relative Luftfeuchtigkeit als ein kritischer Parameter zur Herstellung reproduzierbarer Filme erwiesen hat, wurden die Filme in allen folgenden Untersuchungen – soweit nicht anders vermerkt – bei einer LF von 30 % hergestellt und gegebenenfalls gelagert.

Zusammenfassend ist zu erkennen, dass das verwendete Lösungsmittel sowohl in Lösung als auch im assemblierten Film Einfluss auf die Sekundärstruktur von eADF4(C16) nimmt. HFIP induziert/stabilisiert dabei die Ausbildung von α -Helices und die resultierenden Filme weisen den geringsten β -Faltblatt-Anteil auf. Bei Filmen aus Ameisensäure und Puffer (wL Typ II) liegt dieser deutlich (ca. 10 %) höher. Die IR-Absorptionssignale der beiden organischen Lösungsmittel interferieren dabei nicht mit den Protein-spezifischen Amid I und II-Banden. Das FTIR-Spektrum von HFIP zeigt mehrere charakteristische Absorptionsbanden (s. Abb. 3.8), während Ameisensäure ein Signal bei etwa 1710 cm^{-1} erzeugt (s. Abb. 3.3).

β -Faltblatt-Struktur wird zudem in Filmen aller Lösungsmittel durch Nachbehandlung mit Alkoholen, Kaliumphosphat und – mit Ausnahme von HFIP-Filmen – durch erhöhte Luftfeuchtigkeit induziert. Gleichzeitig wurde dabei in allen Fällen eine Zunahme der für β -Polyalanin spezifischen Signale beobachtet, so dass an der Strukturumlagerung (zumindest teilweise) Alaninreste beteiligt sind. Mit dem Gehalt an β -Faltblättern korreliert die Beständigkeit der Filme gegenüber Wasser, so dass alle nachbehandelten Filme wasserunlöslich sind.

3.1.2 Thermische Stabilität

Temperaturabhängige Änderungen in eADF4(C16) Filmen wurden mittels Thermogravimetrie (TGA) und dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) untersucht. Neben Informationen über Vorgänge auf molekularer Ebene ist die thermische Beständigkeit der Filme auch für technische Anwendungen sowie ihre Sterilisierbarkeit von Interesse. Zum direkten Nachweis struktureller Änderungen wurden zusätzlich temperaturabhängige FTIR-Analysen durchgeführt.

3.1.2.1 Thermogravimetrische Analyse

Mittels TGA wird die Massenänderung einer Probe in Abhängigkeit der Temperatur gemessen. Es wurden sowohl unbehandelte als auch mit Methanol abs. nachbehandelte Filme aus HFIP, Ameisensäure und Puffer untersucht. Die erhaltenen Messkurven sind in Abb. 3.6 gezeigt. Die daraus bestimmten prozentualen Änderungen in der Masse sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

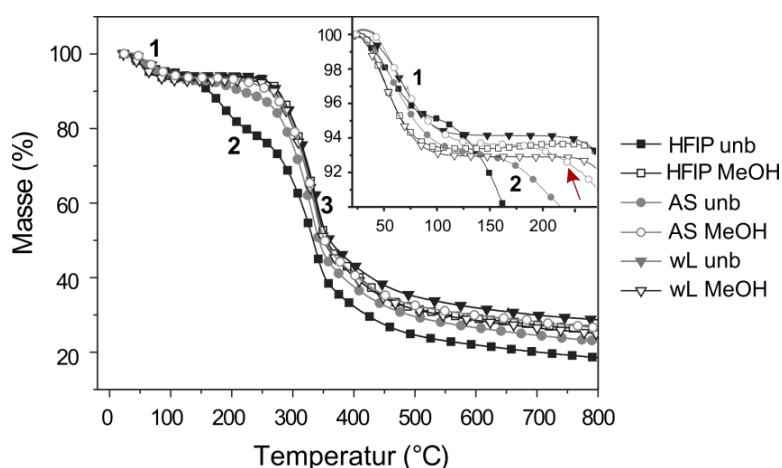


Abb. 3.6: Thermogravimetrische Analyse (TGA) von unbehandelten (unb.) sowie mit Methanol abs. (MeOH) behandelten Filmen aus HFIP, Ameisensäure (AS), und Puffer (wL). Geheizt wurde dabei von Raumtemperatur bis 800 °C mit einer Rate von 10 °C/min unter Stickstoffatmosphäre. Der Temperaturbereich bis 250 °C ist zusätzlich vergrößert dargestellt. Gezeigt sind repräsentative Spektren von jeweils 3 individuellen Messungen. 1, 2, 3 bezieht sich auf die im Text und Tabelle 3.5 zugeordneten Prozesse. Pfeil: Erklärung s. Text (nach Spiess *et al.*, 2011 mit freundlicher Genehmigung des Verlags Royal Society of Chemistry)

In allen Filmen kann im Temperaturbereich zwischen 30 °C und 100 °C eine Abnahme der Masse um 4,9-7,0 % beobachtet werden (Tabelle 3.5, Prozess 1). Die Mittentemperatur T_m (bei der 50 % des beobachteten Masseverlusts eines Prozesses erreicht sind) variiert von 53 °C bis 69 °C. Bei diesem Masseverlust handelt es sich vermutlich um freigesetztes Wasser, eventuell in Kombination mit Resten von organischen Lösungsmitteln. Die Werte liegen dabei im selben Größenbereich wie der mittels Karl-Fischer-Titration ermittelte Wassergehalt. Ab etwa 280 °C tritt ein Masseverlust von 59-68 % auf, der auf thermische Zersetzung des Materials zurückzuführen ist. T_m liegt dabei bei allen Filmen im gleichen Bereich um 335 °C, die Masseabnahme setzt sich jedoch in verminderter Form bis ≥ 800 °C fort. In unbehandelten Filmen aus HFIP tritt zwischen 140 °C und 226 °C ein weiterer Masseverlust von 16,8 % auf (Prozess 2, Tabelle 3.5), was auf Freisetzung gebundenen bzw. eingeschlossenen Lösungsmittels hindeutet (s. 3.1.2.3). Auch Ameisensäure-Filme zeigen eine zusätzlich Abnahme um 5 % im Bereich von 170-280 °C. Dahingegen tritt bei Methanol-behandelten Filmen kein entsprechender Massenverlust auf. Im Fall des behandelten AS-Films beginnt die Massenabnahme (Prozess 3, Tabelle 3.5) allerdings schon bei etwas niedrigerer Temperatur verglichen zu den anderen Filmen (s. Pfeil in Abb. 3.6), was auf zwei sich überlagernde Effekte hindeuten könnte. Möglicherweise handelt es sich hierbei um verbleibendes Lösungsmittel, das, anders als bei HFIP, durch die nachfolgende Methanol-Behandlung nicht komplett verdrängt wurde.

Tabelle 3.5: Überblick über die mittels TGA bestimmte Masseabnahme (Δm) von eADF4(C16) Filmen bei bestimmten Temperaturen. Angegeben sind jeweils die Temperatur des halben Masseverlusts T_m sowie (in Klammern) der relevante Temperaturbereich des jeweiligen Prozesses. (unb.: unbehandelt, Methanol: abs.)

Lösungs- mittel	Nachbe- handlung	Prozess 1		Prozess 2		Prozess 3		übrige Masse bei 800 °C [%]
		T_m [°C]	Δm [%]	T [°C]	Δm [%]	T [°C]	Δm [%]	
HFIP	<i>unb</i>	57 (32-82)	4,9	183 (141-226)	16,8	332 (282-381)	59,8	18,5
	<i>Methanol</i>	53 (32-77)	6,7			335 (284-382)	67,5	25,8
AS	<i>unb</i>	64 (32-97)	7,0	197 (169-282)	5,0	334 (282-388)	65,0	23,0
	<i>Methanol</i>	69 (37-105)	6,6			334 (281-388)	66,9	26,5
wL	<i>unb</i>	68 (41-97)	5,9			336 (286-387)	65,3	28,8
	<i>Methanol</i>	56 (30-80)	7,1			334 (287-387)	68,0	24,9

3.1.2.2 Analyse mittels dynamischer Differenzkalorimetrie

Eine Analyse der Filme mittels dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) zeigte bei allen Proben überlagernde Effekte. Um diese Überlagerungen zu minimieren und zusätzliche Informationen über den jeweilig stattfindenden Prozess zu erhalten, wurden die Proben zyklisch geheizt. Nach Aufheizen auf 110 °C in einem ersten Schritt wurden die Proben bis zu einer Temperatur von -40 °C abgekühlt und anschließend in einem zweiten Schritt auf 400 °C geheizt. Die dabei erhaltenen Spektren sind in Abb. 3.7 b für den zweiten Heizschritt gezeigt. In einem weiteren Experiment wurde ein zusätzlicher Heizzyklus bis 220 °C eingeführt und nach erneutem Abkühlen der Probe erst in einem dritten Schritt auf 400 °C geheizt. Die dabei erhaltenen Kurven sind in Abb. 3.7 a exemplarisch für unbehandelte HFIP-Filme dargestellt.

Alle Proben zeigen ein endothermes Signal unterhalb von 100 °C (Abb. 3.7 a). Der in der TGA beobachtete gleichzeitige Masseverlust deutet darauf hin, dass hier freies Wasser bzw. Lösungsmittel verdampft. Zudem weisen alle Filme einen dominanten endothermen Peak bei etwa 320 °C mit einer unterschiedlich stark ausgeprägten Schulter bei ca. 265-280 °C auf (Abb. 3.7 b, grauer Rahmen). Dies ist charakteristisch für einen zweistufigen Schmelz- bzw. Zersetzungsvorgang (Vasconcelos *et al.*, 2008; Gotoh *et al.*, 1997). Unbehandelte Filme aus den organischen Lösungsmitteln zeigen zusätzlich wesentlich kleinere und verbreiterte endotherme Signale im Bereich zwischen 130 °C und 185 °C (HFIP) sowie 135-195 °C (AS) (Abb. 3.7 b, blauer Rahmen). Zusammen mit der auftretenden Masseabnahme (s. o.) ist dies ein Hinweis auf Verdampfen von gebundenem oder eingeschlossenem Lösungsmittel. Einführen eines weiteren Heizzyklus (bis 220 °C) bekräftigte diese Vermutung, da dieses Signal nicht reproduzierbar war (Abb. 3.7 a, graue und blaue Kurve). Im Fall von HFIP kann das Austreten des Lösungsmittels zudem mittels FTIR-Spektroskopie verfolgt werden (s. Kapitel 3.1.2.3.). In guter Übereinstimmung mit dieser Erklärung zeigen Puffer-Filme und Methanol-behandelte Filme keine oder nur sehr geringe vergleichbare Signale. Durch die Nachbehandlung wird das ursprüngliche Lösungsmittel größtenteils (oder komplett) aus dem Film verdrängt.

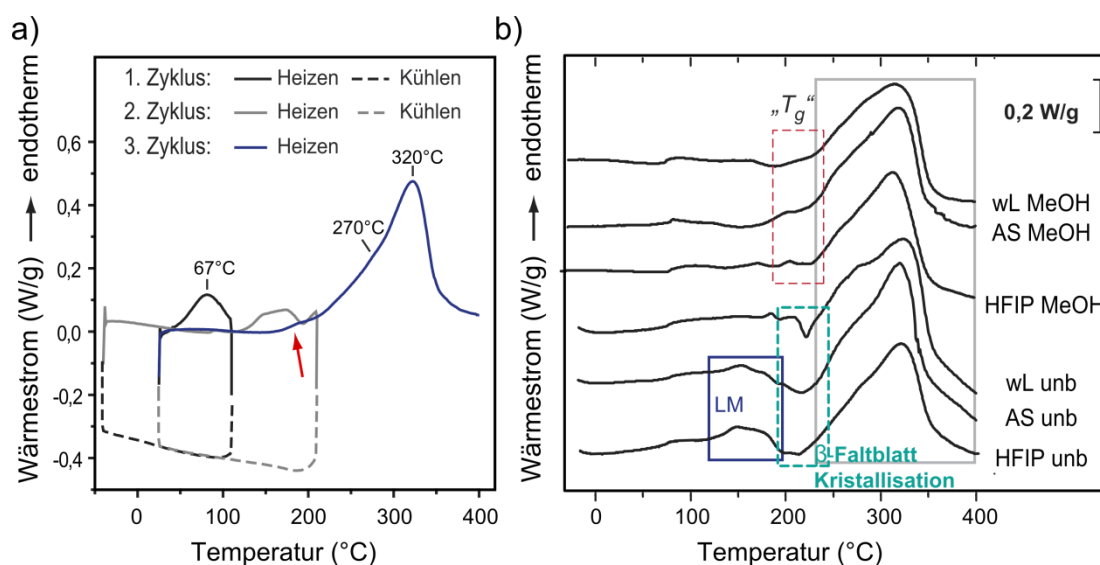


Abb. 3.7: Untersuchung thermischer Eigenschaften von eADF4(C16) Filmen mittels DSC. Filme aus HFIP, Ameisensäure (AS) sowie Puffer (wL) wurden vor (unb.) bzw. nach (MeOH) Methanol abs.-Behandlung in Stickstoff-Atmosphäre analysiert. Die Proben wurden in Zyklen geheizt, die Heizrate betrug dabei 5 °C/min. In (a) sind die individuellen Zyklen exemplarisch für unbehandelte HFIP-Filme gezeigt. Im 3. Heizzyklus tritt anstelle eines endothermen Peaks ein endothermer Kurvenversatz auf (Pfeil). (b) Zusammenfassung der DSC-Kurven aller Filme, wobei der 1. Zyklus dem in (a) entsprach und in einem 2. Zyklus direkt bis 400 °C geheizt wurde. Der Übersichtlichkeit halber ist nur der 2. Heizschritt dargestellt. (LM: Lösungsmittel, T_g : Glasübergangstemperatur)

(nach Spiess *et al.*, 2011 mit freundlicher Genehmigung des Verlags Royal Society of Chemistry)

In allen unbehandelten Filmen treten exotherme Signale auf, bei Filmen aus HFIP bei 200–210 °C, aus AS bei etwa 215 °C und aus Puffer bei 221 °C (Abb. 3.7 b, grüner Rahmen). Wiederum zeigte wiederholtes Aufheizen, dass es sich um einen nicht-reversiblen Prozess handelt. Für regeneriertes *B. mori* Seidenfibroin wurden entsprechende Signale Übergängen in der Sekundärstruktur zugeschrieben (Hu *et al.*, 2006; Motta *et al.*, 2002). Ungeordnete Strukturen oder α -Helices werden dabei in β -Faltblatt-Struktur umgelagert. Diese Interpretation stimmt gut mit dem Fehlen solcher exothermer Signale in nachbehandelten Filmen überein. Da diese bereits durch die Nachbehandlung in eine β -Faltblatt-reiche Struktur überführt worden sind, ist hier keine weitere Strukturumlagerung zu beobachten.

Weiterhin ist in den DSC-Kurven der Methanol-behandelten Filme ein Versatz im Bereich von 195 °C bis 210 °C zu sehen (Abb. 3.7 b, roter Rahmen). In Anlehnung an Studien mit *B. mori* Seide kann dies als eine Art Glasübergang interpretiert werden (Motta *et al.*, 2002; Vasconcelos *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2006), bei dem sich die Beweglichkeit/Freiheitsgrade der Moleküle erhöht. Die entsprechenden Messkurven von Filmen ohne Nachbehandlung zeigen keinen deutlichen Versatz (Abb. 3.7 b). Bei Heizen in mehreren individuellen Zyklen tritt jedoch auch hier ein Übergang auf (Pfeil in Abb. 3.7 a), so dass vermutlich die Evaporation von Lösungsmittel sowie die stattfindende strukturelle Umlagerung diesen Effekt in Abb. 3.7 b überlagern.

3.1.2.3 Einfluss der Temperatur auf die Sekundärstruktur

Da die Untersuchung mittels DSC auf temperaturabhängige Änderungen in der Sekundärstruktur hindeutete, wurden FTIR-Spektren der Filme bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen. Die jeweilige Probe wurde dazu in einer verschlossenen heizbaren Apparatur (welche mit N₂ gespült wurde) direkt in dem Strahl des Spektrometers platziert.

Dabei zeigt sich bei allen unbehandelten Filmen eine Verschiebung des Maximums der Amid I-Bande hin zu Wellenzahlen spezifisch für β -Faltblatt-Strukturen (1625 cm⁻¹) bzw. eine Zunahme des Quotienten 1625 cm⁻¹/1657 cm⁻¹ (Abb. 3.8). Diese Zunahme an β -Faltblatt-Struktur beginnt bei Filmen aus HFIP bei etwa 210 °C. Bei Filmen aus Ameisensäure und wL tritt eine entsprechende Zunahme ab 220 °C bzw. 230 °C auf. An Spektren von unbehandelten HFIP-Filmen können zudem weitere Effekte beobachtet werden (Abb. 3.8 a). Zum einen ist im Temperaturbereich der Verschiebung der Amid I-Bande eine Induktion des β -Polyalanin-Peaks zu erkennen. Zum anderen kann ein Rückgang der für HFIP spezifischen Absorptionsbanden beobachtet werden. Dieser korreliert dabei gut mit den beiden genannten Strukturänderungen.

In durch Methanol-Behandlung bereits β -Faltblatt-reichen Filmen hingegen war kein signifikanter Einfluss erhöhter Temperatur zu erkennen (Abb. 3.8 c).

Die Temperatur-induzierte Strukturänderung ist dabei irreversibel und bleibt nach Abkühlen der Probe erhalten. Das Maximum bei 1625 cm⁻¹ war sogar nach Abkühlen stärker ausgeprägt (Abb. 3.8 b). Vermutlich ist dies allerdings auf kinetische Effekte zurückzuführen. Die oben gezeigten Messungen wurden in Schritten von 10 °C durchgeführt, wobei die Spektren innerhalb 2-5 min nach Erreichen der Temperatur aufgenommen wurden. Um kinetische Einflüsse aufzuklären, wurden Filme zudem bei verschiedenen Temperaturen (100 °C, 150 °C, 200 °C, 240 °C) in einem Ofen 20-60 min inkubiert. Hierbei trat unterhalb 200 °C auch nach 60 min keine Strukturänderung auf. Bei Inkubation \geq 200 °C hingegen zeigte sich eine zeit- und temperaturabhängige Verschiebung des Maximums im FTIR-Signal. Die Verschiebung war jeweils etwas ausgeprägter als bei der Vergleichsmessung bei kontinuierlichem Heizen und erreichte ihr Maximum nach Inkubation der Filme bei 240 °C.

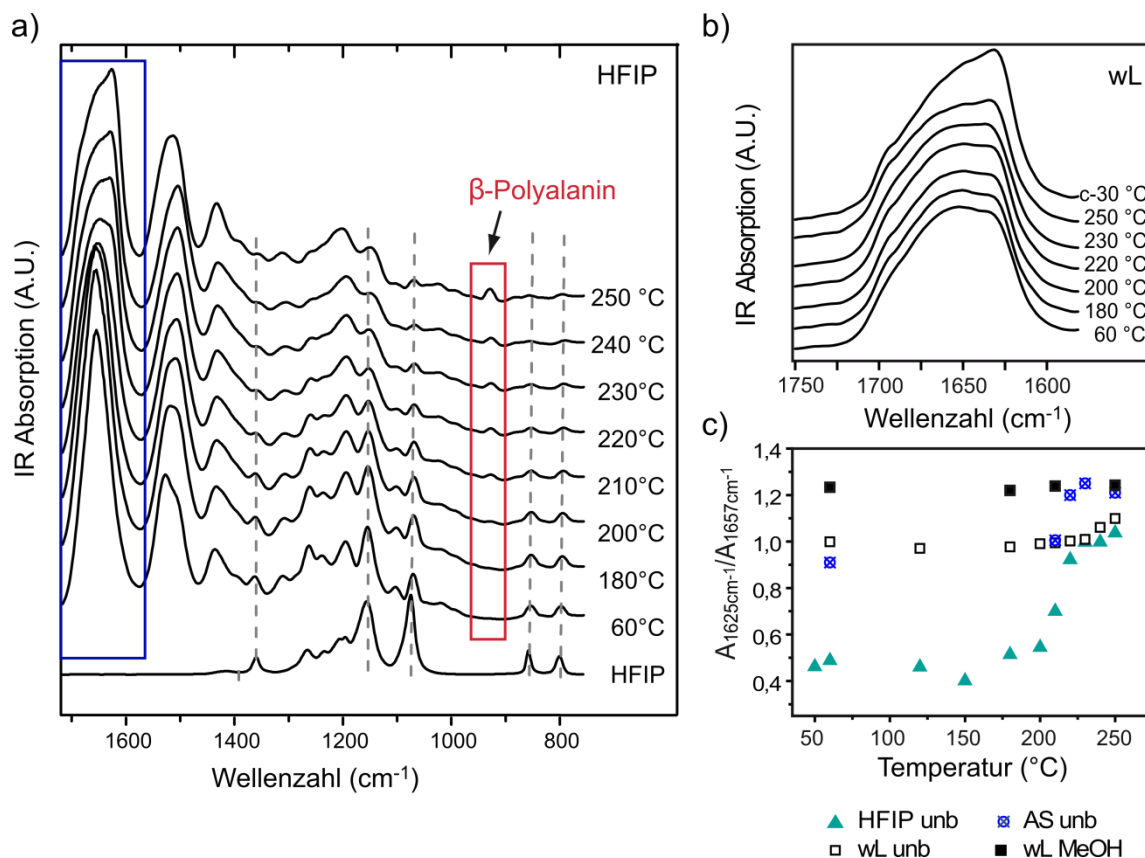


Abb. 3.8: Änderung der Sekundärstruktur von eADF4(C16) Filmen in Abhängigkeit der Temperatur. Die Filme wurden in einer verschließbaren Heizapparatur in dem Strahlengang des FTIR-Spektrometers platziert und während des Aufheizens analysiert. Gezeigt sind die Spektren unbehandelter HFIP-Filme im Bereich 1780-800 cm^{-1} (a), die Amid I-Bande unbehandelter wL-Filme (b) sowie der Quotient der Absorptionswerte bei 1625 cm^{-1} / 1657 cm^{-1} (c). Stellvertretend für Methanol-behandelte Filme ist ein wL-Film gezeigt. (MeOH: Methanol abs.; c-30 °C: FTIR-Spektren nach anschließendem Abkühlen der Probe)
(nach Spiess *et al.*, 2011 mit freundlicher Genehmigung des Verlags Royal Society of Chemistry)

Insgesamt erwiesen sich alle eADF4(C16)-Filme bis zu Temperaturen ≥ 280 °C als stabil. Die erhaltenen FTIR-Spektren deuten auf strukturelle Integrität der Filme hin, wobei allerdings in unbehandelten Filmen eine Strukturänderung hin zu erhöhtem β -Faltblatt-Anteil auftritt. Auch TGA- und DSC-Messungen zeigen ab 285 °C den Beginn thermischer Zersetzung, die bei 330 °C zu einem erheblichen Masseverlust führt.

3.1.3 Mechanische Charakterisierung

Neben der Analyse ihrer Sekundärstruktur und ihres thermischen Verhaltens wurden die rekombinanten Spinnenseidenfilme hinsichtlich ihrer mechanischen Eigenschaften charakterisiert. Das mechanische Verhalten von (Bio-)Polymeren wird unter anderem von der Struktur und Verknüpfung ihrer Monomere bestimmt. Da das verwendete Lösungsmittel bereits einen deutlichen Einfluss auf die Sekundärstruktur der Proteine in den Filmen gezeigt hatte, wurde im Folgenden ein daraus resultierender Einfluss auf das mechanische Verhalten der Filme untersucht. Neben den verschiedenen Lösungsmitteln (HFIP, AS, wL) wurde auch die Auswirkung einer Nachbehandlung mit Methanol betrachtet.

3.1.3.1 Zugbelastung

Mittels Zugversuch wurde die maximale Zugfestigkeit σ der Filme sowie ihre Bruchdehnung ϵ ermittelt. Aus der Anfangssteigung der erhaltenen Spannungs-Dehnungs-Kurve kann zusätzlich der E-Modul ermittelt werden, der Aufschluss über den Widerstand eines Materials gegen irreversible Verformung gibt. Die Integration der Kurve ergibt die Zähigkeit der Probe.

Die bei 30 % LF hergestellten Filme wurden in Streifen von 1-2 mm Breite geschnitten, die Ausgangslänge betrug 10 mm. In die Berechnung der Zugfestigkeit bzw. des E-Moduls aus der aufgewendeten Kraft geht die Querschnittsfläche der Filme ein (s. Kapitel 2.7.3). Da bei dem in dieser Arbeit verwendeten Gussverfahren nicht absolut sichergestellt werden kann, dass die resultierenden Filme nach ihrer Trocknung eine homogene Dicke besitzen, wurde diese für jede einzelne Probe gesondert unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Filmdicke v. a. in den Randbereichen schwankte, wohl bedingt durch Konvektionsprozesse. Im Inneren jedoch wiesen die Filme eine homogene Dicke von $11 \pm 1 \mu\text{m}$ auf. Die Zugmessungen wurden (aufgrund der räumlichen Gegebenheiten) bei 41 ± 1 % LF durchgeführt.

Abb. 3.9 a zeigt repräsentative Spannungs-Dehnungs-Kurven von Filmen gegossen aus Lösungen in HFIP, Ameisensäure und Puffer (wL), jeweils unbehandelt sowie nach Methanol Behandlung. Einzelne Proben des wL-Films ergaben unterschiedliche Ergebnisse, so dass sie wiederum in zwei Gruppen zusammengefasst wurden. FTIR-Analyse ergab eine unterschiedliche Zusammensetzung in ihrer Sekundärstruktur, die den Typen wL I und II aus Abb. 3.2. (Kapitel 3.1.1.1) entsprach.

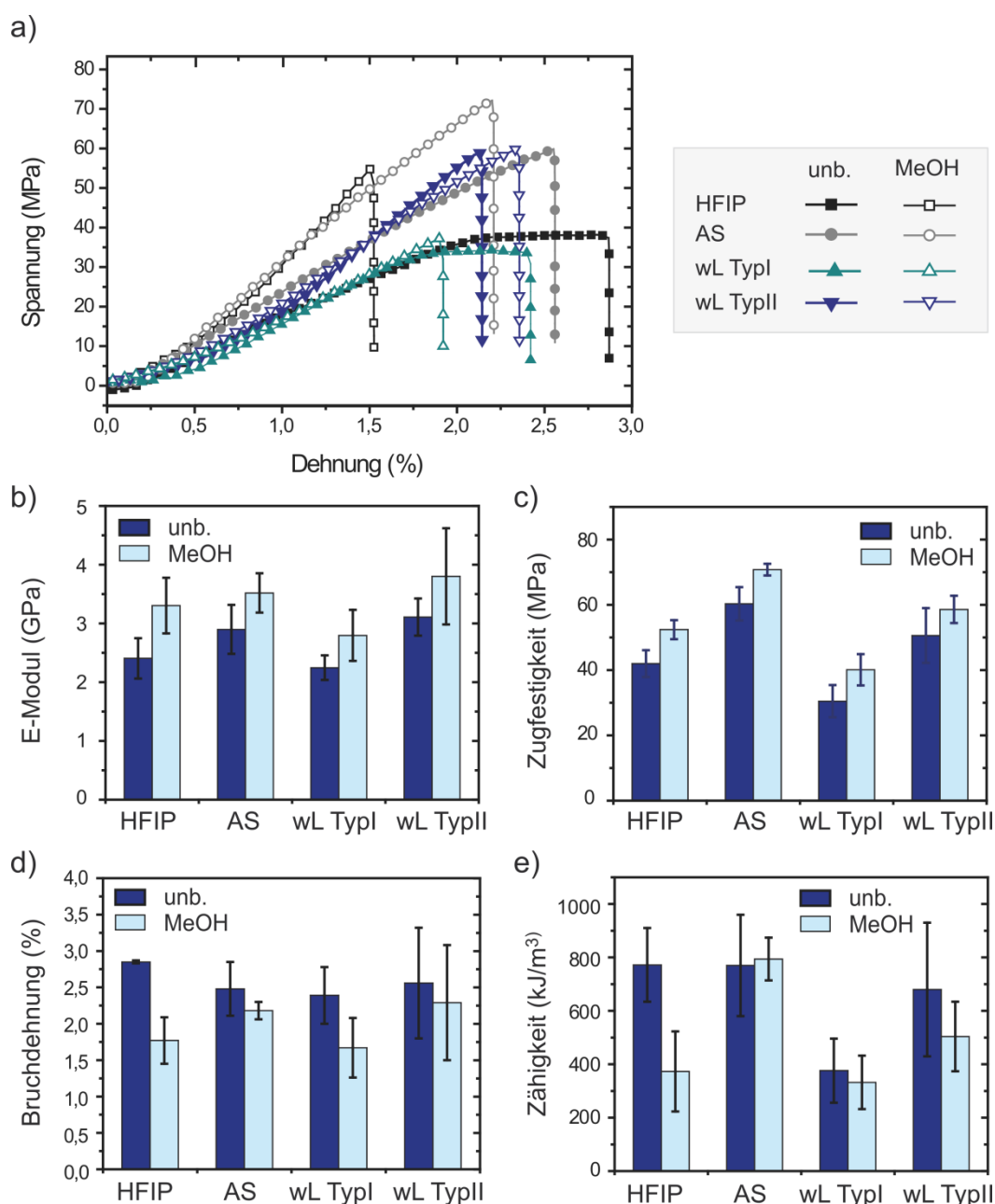


Abb. 3.9: Mechanische Eigenschaften von eADF4(C16) Filmen. (a) Typische Spannungs-Dehnungs-Kurven von Filmen aus unterschiedlichen Lösungsmitteln vor (gefüllte Symbole) bzw. nach Behandlung mit Methanol abs. (ungefüllte Symbole). Die Filmdicke betrug dabei $11 \pm 1 \mu\text{m}$. (b-e): Aus den Spannungs-Dehnungs-Kurven erhaltene mechanische Parameter. (b) E-Modul, (c) Zugfestigkeit, (d) Bruchdehnung, (e) Zähigkeit. Unb: unbehandelt, AS: Ameisensäure, wL: wässrige Lösung (nach Spiess *et al.*, 2011 mit freundlicher Genehmigung des Verlags Royal Society of Chemistry)

Die Spannungs-Dehnungs-Kurven unbehandelter Ameisensäure- und Typ II wL-Filme weisen bis zum Reißen (zu sehen in einem abrupten Abfall der Spannung) einen annähernd linearen Anstieg auf (Abb. 3.9). Der abgeflachte initiale Kurvenverlauf, welcher bei einigen Proben beobachtet wurde, ist auf die Streckung lose eingespannter Filme zurückzuführen. Alle nachbehandelten Filme zeigen einen den unbehandelten Proben entsprechenden Kurvenverlauf und reißen somit innerhalb des linear-elastischen Bereichs. Die Spannungs-Dehnungs-Kurven von unbehandelten HFIP- und wL Typ I- Filmen hingegen flachen nach einer

Dehnung von 1,7-2 % ab und erreichen ein Plateau, was auf eine plastische Verformung des Materials hindeutet. Die aus den Messkurven erhaltenen und gemittelten mechanischen Kenngrößen (Abb. 3.9 b-e) zeigen, dass diese Filme zudem deutlich geringere Zugfestigkeit und Steifigkeit als die anderen Filme besitzen, was – zumindest im Fall des HFIP Films – aber mit einer um ca. 15 % höheren Bruchdehnung einhergeht. Die Nachbehandlung mit Methanol führte in allen Fällen zu einer Erhöhung der E-Moduln und Zugfestigkeiten verglichen mit ihrem unbehandelten Pendant aus dem jeweiligen Lösungsmittel. Gleichzeitig verringert sich dabei die Bruchdehnung. Filme aus Ameisensäure weisen durch Kombination ihrer spezifischen Zugfestigkeit und Bruchdehnung sowohl mit als auch ohne Behandlung die höchste Zähigkeit auf.

In Abhängigkeit der Luftfeuchtigkeit variierten die absoluten Werte der mechanischen Kenngrößen. So wurden in einem separaten Versuch niedrigere E-Moduln in Kombination mit erhöhter Bruchdehnung gemessen. Die maximale Zugfestigkeit variierte hingegen kaum. Die generellen Tendenzen des Einflusses unterschiedlicher Lösungsmittel sowie der Methanol-Behandlung waren jedoch unverändert. Insgesamt zeigt sich, dass Filme mit höherem β -Faltblatt-Anteil steifer sind und eine höhere Zugfestigkeit besitzen.

3.1.3.2 Dynamisch mechanisches Verhalten

Um zu überprüfen, inwiefern sich das mechanische Verhalten der Filme in Abhängigkeit der Temperatur ändert, wurden sie mittels dynamisch mechanischer Analyse (DMA) untersucht. Mit dieser Methode kann der komplexe Modul eines Materials – zusammengesetzt aus dem Speichermodul sowie dem Verlustmodul – bestimmt werden und erlaubt damit Rückschlüsse auf Veränderungen auf molekularer Ebene.

Die erhaltenen Ergebnisse aller Filme gleichen sich in ihren Hauptmerkmalen des Kurvenverlaufs (s. Abb. 3.10). Der Speichermodul E' liegt bei allen etwa eine Zehnerpotenz höher (Faktor 25-35) als der Verlustmodul. Daraus ergibt sich ein Phasenwinkel δ von 1-2°, was auf ein festes Material hindeutet. Bis ca. 90 °C steigt E' leicht an, was einer geringen Versteifung/Verfestigung der Filme entspricht. Dies lässt sich vermutlich auf den Verlust von Wasser zurückführen. Anschließend bleibt der Speichermodul E' weitgehend unverändert, bis er schließlich bei der Temperatur T'' auf etwa 10 % des Anfangswertes steil abfällt (Abb. 3.10). Damit einher geht ein starker Anstieg des Verlustmoduls E'' , der bei T'' ein Maximum erreicht. Dieser Bereich kann in Anlehnung an Polymertheorie als Glasübergangstemperatur interpretiert werden, da sich die Reaktion des Films und der darin enthaltenen Moleküle auf die angelegte Kraft verändert. Der Film reagiert hier nicht mehr steif (elastisch), sondern es kommt zu einer irreversiblen Streckung, was sich in einer Längenänderung der Probe äußert.

Im Fall von Ameisensäure-Filmen betrug diese etwa 25 % (Abb. 3.10). Unbehandelte HFIP-Filme dehnten sich dabei mit über 100 % am stärksten.

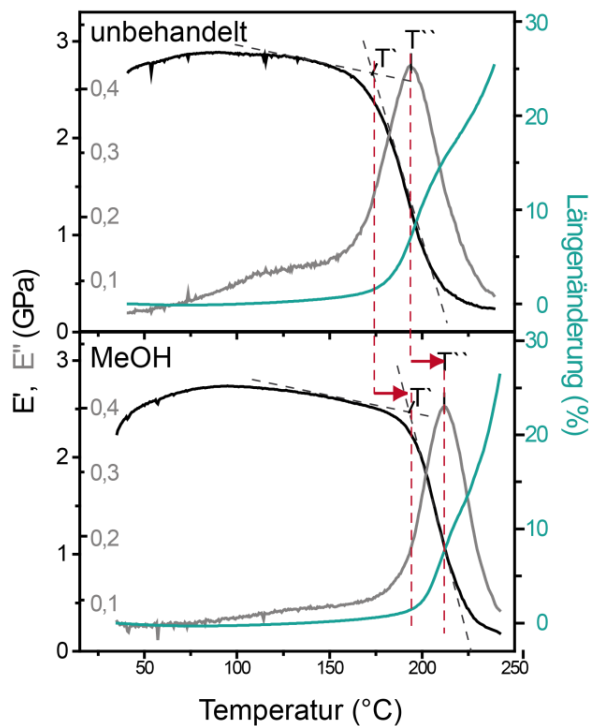


Abb. 3.10: Dynamisch mechanische Analyse von eADF4(C16) Filmen, exemplarisch gezeigt an Filmen aus Ameisensäure. Dargestellt sind der Speichermodul E' (schwarz), der Verlustmodul E'' (grau) sowie die Längenänderung der Probe (grün) in Abhängigkeit der Temperatur. T' markiert die Temperatur der Abnahme in E' , T'' die Temperatur des Maximums in E'' . Die Messungen wurden mit einer Heizrate von 2 °C/min und einer Frequenz von 5 Hz bei einer Amplitude von $0,08\%$ der ursprünglichen Länge durchgeführt. Die Filmdicke betrug bei HFIP-Filmen $9 \pm 1\text{ }\mu\text{m}$, bei allen anderen Filmen $11 \pm 1\text{ }\mu\text{m}$. Die erhaltenen Werte für T' und T'' aller Filme sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Die Temperatur T' , ab welcher der Speichermodul abnimmt, zeigt eine deutliche Abhängigkeit von dem verwendeten Lösungsmittel (s. Tabelle 3.6). Wiederum führten die bereits beschriebenen zwei Typen an wL-Filmen (vgl. Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.3.1) zu unterschiedlichen Ergebnissen. Bedingt durch die geringe Probengröße (die Filme wurden in Streifen von ca. 1 mm Breite geschnitten) kommen hier die lokalen Unterschiede innerhalb eines solchen Films zum Tragen. In unbehandelten Filmen steigt T' von Filmen gegossen aus HFIP über wL Typ I und Ameisensäure bis hin zu wL Typ II von 150 °C auf 185 °C an. Auch T'' nimmt in derselben Reihenfolge zu. Bezogen auf den Gehalt an β -Faltblatt-Struktur nimmt T' von Filmen mit 20% β -Faltblatt Anteil (HFIP) zu Filmen mit 31% (wL Typ II) um 35 °C zu.

Durch Behandlung der individuellen Filme mit Methanol verschieben sich beide Temperaturen T' und T'' zu höheren Werten (Abb. 3.10 unten). Die Verschiebung ist dabei bei Behandlung mit Methanol abs. stärker ausgeprägt als nach Inkubation mit 70% Methanol (gemessen an HFIP-Filmen). Wie auch bei den unbehandelten Filmen unterscheidet sich T' je nach verwendetem Lösungsmittel, während T'' bei allen untersuchten Filmen denselben Wert annimmt. Im Gegensatz zu unbehandelten Filmen kann hier jedoch kein direkter Zusammenhang mit der Sekundärstruktur-Zusammensetzung hergestellt werden.

Tabelle 3.6: Zusammenstellung von mechanischen Parametern von eADF4(C16) Filmen bestimmt mittels dynamisch mechanischer Analyse. Angegeben sind die Temperatur T'' (Beginn der Abnahme des Speichermoduls E''), sowie die Temperatur des Maximums des Verlustmoduls E'' (T'') (s. Abb. 3.10). Die Filme wurden sowohl unbehandelt (unb.) als auch nach Behandlung mit Methanol abs. oder 70 % (MeOH) analysiert. (n. b.: Die Werte konnten nicht bestimmt werden)

	HFIP			Ameisensäure		wäss. Lösung			
	Unb.	MeOH (abs.)	MeOH (70 %)	Unb.	MeOH (abs.)	Unb. I	Unb. II	MeOH I (abs.)	MeOH II (abs.)
$T' [^{\circ}\text{C}]$	151,8 $\pm 6,0$	204,5 $\pm 6,5$	198,6 $\pm 1,7$	174,5 $\pm 0,3$	193,5	163,7	185,3 $\pm 0,6$	171,1	198,6 $\pm 1,7$
$T'' [^{\circ}\text{C}]$	163,0 $\pm 8,4$	213,5	213,3 $\pm 3,8$	193,5 $\pm 1,5$	212,2	178,3	n.b.	n.b.	213,4 $\pm 3,8$

3.1.3.3 Orientierung der Moleküle unter Zugbelastung

Polarisierte FTIR-Messungen an ungestreckten Filmen

FTIR-spektroskopische Messung unter verschiedenen Polarisationswinkeln kann Aufschluss über die Ausrichtung chemischer Gruppen geben. Im natürlichen Seidenfaden liegen die Proteinmoleküle stark ausgerichtet vor, was durch den komplexen Vorgang des Spinnprozesses ermöglicht wird. Einige Studien zeigten, dass die mechanischen Eigenschaften des Fadens mit dem Grad der molekularen Ausrichtung korrelieren (Papadopoulos *et al.*, 2009b; Glisovic *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2006; Riekel *et al.*, 2000; Perez-Rigueiro *et al.*, 2005).

Keiner der hier untersuchten Filme zeigte bei FTIR-Messung unter verschiedenen Polarisationswinkeln Dichroismus. Wie Abb. 3.11 am Beispiel von unbehandelten Filmen aus wässriger Lösung (a) sowie Methanol-behandelten Ameisensäure-Filmen (b) zeigt, sind keine signifikanten Unterschiede zwischen parallel (0°) oder senkrecht (90°) polarisierten Messungen zu erkennen. Daraus kann geschlossen werden, dass die Strukturmerkmale in den Filmen isotrop verteilt sind, unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel oder der Nachbehandlung. Eine Ausrichtung der Moleküle wäre bei der verwendeten Herstellungsmethode auch nicht zu erwarten, da hier kein äußerer Druck ausgeübt wurde (sei es durch z. B. im Spinnprozess auftretende Scherkräfte).

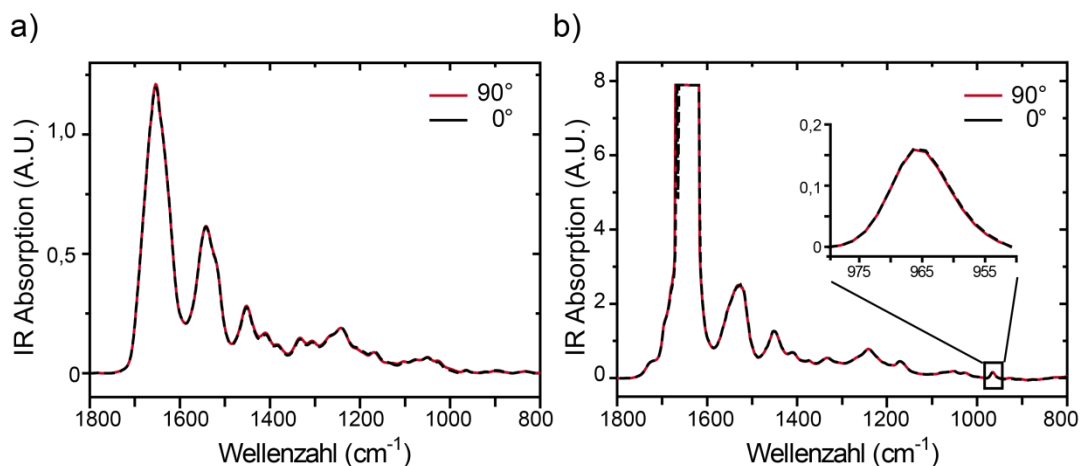


Abb. 3.11: FTIR-Spektren von eADF4(C16) Filmen gegossen aus wässriger Pufferlösung (wL) ohne Nachbehandlung (a) und aus Ameisensäure mit Methanol abs.-Nachbehandlung (b). Die Spektren wurden jeweils unter 0° und 90° Polarisation aufgenommen. Die Vergrößerung in (b) zeigt die für β -Polyalanin spezifische Absorptionsbande.

Kombinierte mechanische und FTIR-spektroskopische Messungen

Um zu untersuchen, ob sich Molekülgruppen in den Filmen unter Zugbelastung ausrichten, wurde die polarisierte FTIR-Messung mit mechanischem Zug kombiniert. Die Messungen wurden in Kooperation mit Roxana Ene, AG Prof. Friedrich Kremer, Institut für Experimentelle Physik der Universität Leipzig, durchgeführt. Die Filme wurden dazu in einer Apparatur befestigt, mit der die Filme mit Hilfe von Mikrometerschrauben präzise gestreckt werden konnten und die dabei aufgewendete Kraft gemessen wurde (s. Kapitel 2.5.4.2). Diese Apparatur wurde direkt im Strahlengang des Spektrometers platziert. Für die Messungen wurden die Filme schrittweise gedehnt (Abb. 3.12). Nach Relaxation der Probe nach dem jeweiligen Schritt wurden FTIR-Spektren bei elf Polarisationswinkeln zwischen 0° und 180° aufgenommen. Die erhaltenen Spannungskurven sind in Abb. 3.12 exemplarisch für Ameisensäure-Filme dargestellt, die der restlichen Filme sind im Anhang gezeigt (Kapitel 10.1). Auffallend ist dabei der qualitative Unterschied der Relaxation: während diese bei den unbehandelten Filmen gering ausfiel, war nach Methanol-Behandlung ein starker Rückgang der Kraft bzw. Spannung sofort nach der Streckung zu beobachten. Aufgrund der unterschiedlichen experimentellen Durchführung weichen die hier bei schrittweiser Dehnung auftretenden Spannungs- sowie Bruchdehnungswerte etwas von denen der kontinuierlichen Zugmessung (vgl. 3.1.3.1) ab.

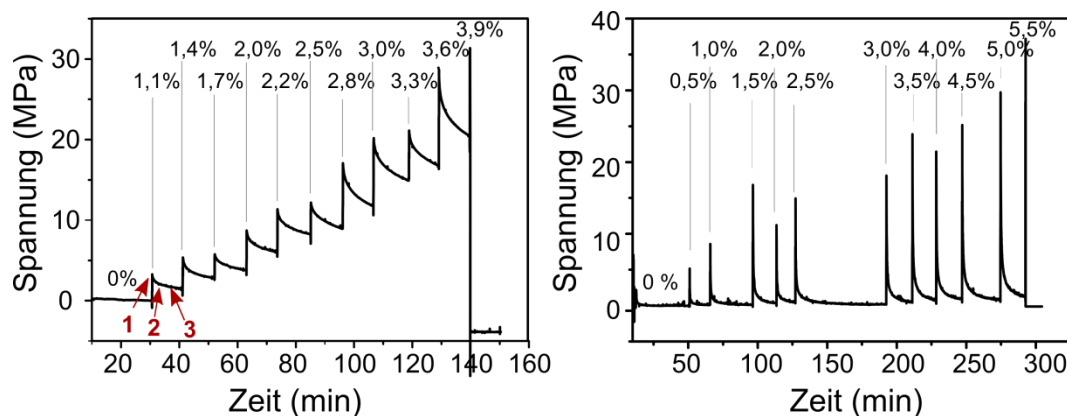


Abb. 3.12: Auftretende Spannung bei schrittweiser Dehnung von eADF4(C16)-Filmen im zeitlichen Verlauf. Die jeweils aufgebrachte Dehnung (in % der ursprünglichen Filmlänge) ist ebenfalls angegeben. Exemplarisch ist die Messung eines unbehandelten (a) sowie eines Methanol-behandelten (b) Ameisensäure-Films gezeigt. Das Experiment wurde wie folgt durchgeführt: Die Probe wurde mittels Mikrometerschraube um eine definierte Länge gedehnt (0,3-0,5 % der ursprünglichen Filmlänge), was zu einem steilen Signal im Kraftsensor führt (1). Nach anschließender Relaxation der Probe (2) wurden polarisierte FTIR-Messungen durchgeführt (3). Die Spannung entspricht der gemessenen Kraft pro Querschnittsfläche des Filmes, welche für jeden Film individuell bestimmt wurde.

(nach Spiess *et al.* 2011 mit freundlicher Genehmigung des Verlags Royal Society of Chemistry)

Da die erhaltenen FTIR-Spektren im Bereich der Amid I- und II-Bande teilweise zu stark streuten und damit keine Analyse möglich war (s. Abb. 3.11 b), konzentrierte sich die Auswertung der polarisierten Spektren auf die für β -Polyalanin spezifische Absorptionsbande um 965 cm^{-1} . Diese Auswertung bietet zudem einige Vorteile. Während bei der Amid I-Bande eine genaue Zuordnung beobachteter Effekte durch die Überlagerung mehrerer Schwingungen erschwert wird, ist die Zuordnung im Fall der β -Polyalanin Bande eindeutig. Des Weiteren gelten Polyalanin-Kristalle im natürlichen Spinnenseidenfaden als Ursache der hohen Festigkeit und Steifheit (Buehler & Yung, 2009). Dementsprechend zeigte diese Bande bei Untersuchungen an Spinnenseidenfäden die stärksten Änderungen bei mechanischer Beanspruchung. Mit Hilfe eines quantenmechanischen Modells konnte zudem gezeigt werden, dass eine Verschiebung dieser Bande direkt mit einer extern angelegten Kraft korreliert (Papadopoulos *et al.*, 2007).

Bei Betrachtung dieser Absorptionsbande zeigt sich in Filmen aus wässriger Lösung (ohne bzw. mit Nachbehandlung) und unbehandelten Ameisensäure-Filmen mit zunehmender Dehnung des Films eine leichte Verschiebung des Peakmaximums hin zu niedrigeren Wellenzahlen (Abb. 3.13 a). Im Falle des unbehandelten wL-Filmes tritt diese Verschiebung ab einer Dehnung von 4,5 % auf, in den beiden anderen Filmen bereits ab Überschreiten von 1 % Dehnung. In Anlehnung an Messungen an natürlichen Spinnenfäden kann dies als Übertragung der extern angelegten Kraft auf β -Polyalanin-Strukturen interpretiert werden, die bei den Filmen jedoch – anders als im Faden – nicht sofort, sondern erst nach einer gewissen Dehnung erfolgt (Papadopoulos *et al.*, 2007; Papadopoulos *et al.*, 2009b; Ene *et al.*, 2009).

Mit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums um $0,2\text{--}0,4\text{ cm}^{-1}$ erscheint die Änderung zunächst klein; unter Einbeziehung der dabei aufgewendeten Kraft ergibt sich jedoch beispielsweise im Fall des AS-Films eine Änderung von $3\text{--}5\text{ cm}^{-1}/\text{GPa}$, und liegt damit in einem ähnlichen Größenordnungsbereich wie der am natürlichen Faden beobachtete Effekt (Ene *et al.*, 2009; Papadopoulos *et al.*, 2007). Allerdings muss dabei beachtet werden, dass das aufgestellte Modell der Kraftübertragung in der Molekülgeometrie limitiert ist. Da diese in den Filmen möglicherweise abweicht, kann an dieser Stelle nur ein qualitativer Vergleich zum Seidenfaden erfolgen. In den Methanol-behandelten Filmen aus HFIP und AS hingegen ist keine solche Verschiebung zu erkennen.

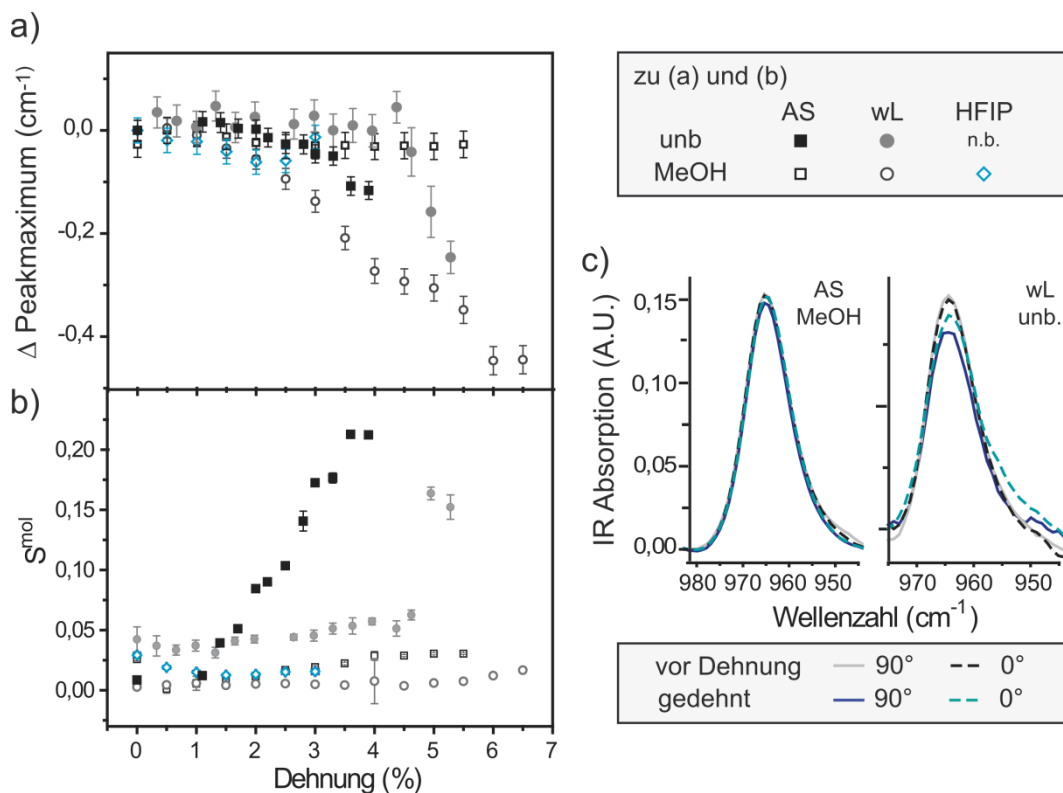


Abb. 3.13: Analyse der für β -Polyalanin spezifischen IR-Absorptionsbande (965 cm^{-1}) bei schrittweiser Dehnung von verschiedenen eADF4(C16) Filmen (wie angegeben). (a) Verschiebung des Peak-Maximums relativ zur Position im ungedehnten Film. (b) Aus polarisierten FTIR-Messungen berechneter Ordnungsparameter S^{mol} in Abhängigkeit der Dehnung. (c) Originalspektren der IR-Absorption bei 0° und 90° Polarisation, jeweils vor bzw. nach Dehnung der Filme. Exemplarisch für Filme ohne signifikante Änderung ist ein Methanol-behandelter AS-Film (links) dargestellt, während bei unbehandelten Puffer-Filmen Änderungen auftreten (rechts).

(nach Spiess *et al.* 2011 mit freundlicher Genehmigung des Verlags Royal Society of Chemistry)

Aus der unter verschiedenen Polarisationswinkeln erhaltenen Fläche des Peaks kann eine Aussage über die Orientierung der angeregten Bindung getroffen werden (Kapitel 2.5.4.3). Der dabei berechnete molekulare Ordnungsparameter S^{mol} ergab für alle Filme vor Streckung einen Wert ~ 0 . Dies bedeutet keinerlei Orientierung der Bindung und bestätigt somit die oben für das gesamte Protein-IR-Spektrum getroffene Aussage. Mit zunehmender Dehnung der Filme erhöht sich S^{mol} in den unbehandelten Filmen (aus Ameisensäure und wässriger Lösung

wL) (Abb. 3.13 b). Der Effekt beginnt wiederum erst nach einer gewissen Dehnung, die mit der Verschiebung des Absorptionsmaximums übereinstimmt. Danach steigt S^{mol} linear mit zunehmender Dehnung an und erreicht einen Endwert (vor dem Reißen des Filmes) von 0,18 bzw. 0,22. Da ein Wert von +1 bei einer vollständigen Ausrichtung aller Bindungen parallel zur Probenachse erreicht wird, deutet dieses Ergebnis auf eine teilweise Ausrichtung der N-C $_{\alpha}$ -Bindungen von β -Polyalanin-Strukturen in Richtung der Zugkraft hin. Der Vergleichswert der hoch ausgerichteten β -Polyalanine in natürlicher *dragline* Seide liegt bei 0,9 (Papadopoulos *et al.*, 2007). Hingegen war bei keinem der Filme nach Behandlung mit Methanol eine Zunahme von S^{mol} zu sehen, was darauf hindeutet, dass hier keine Ausrichtung/Umorientierung von β -Polyalaninen stattfindet.

Da in HFIP Filmen ohne Behandlung keine entsprechende Absorptionsbande bei 965 cm $^{-1}$ auftritt, konnten für diesen Film keine Aussagen getroffen werden. Im Fall des Filmes aus wässriger Lösung wurde hier nur an einer Stelle des Films gemessen, wodurch eventuelle regionale Unterschiede (wie oben beschrieben) nicht erfasst wurden.

Die erhaltenen Ergebnisse deuten somit (in einigen Filmen) auf eine teilweise Ausrichtung der β -Polyalanine hin, nicht jedoch auf eine Zunahme an β -Faltblatt-Struktur. So trat in keinem der Filme eine Erhöhung der Absorption bei etwa 965 cm $^{-1}$ auf, noch wurde eine Änderung der Amid I-Bande beobachtet, sofern es die Auflösung zuließ.

3.1.4 Charakterisierung der Filmoberfläche

Die Natur der Filmoberfläche ist bei der Interaktion mit angrenzenden Phasen (biologisches oder anderes Material) von entscheidender Bedeutung. Wichtige Parameter sind dabei die Topographie sowie die Hydrophilie der Oberfläche. Wiederum wurden Filme gegossen aus den verschiedenen Lösungsmitteln mit bzw. ohne Nachbehandlung verglichen. Aufgrund der Relevanz hinsichtlich späterer Anwendung der Filme in der Kultivierung von Zellen wurde neben Methanol und Ethanol abs. auch der Effekt von Kaliumphosphat-Behandlung und 70 % Methanol bzw. Ethanol untersucht.

3.1.4.1 Topographie

Untersuchung verschiedener Filme mittels REM gab einen ersten Überblick über die Filmoberfläche. Ausgewählte Beispiele sind in Abb. 3.14 gezeigt, die restlichen Aufnahmen sind in Kapitel 10.2 (Anhang) zu finden. Die untersuchten Filme besaßen eine Dicke von 1-2 μm (Abb. 3.14 A und E).

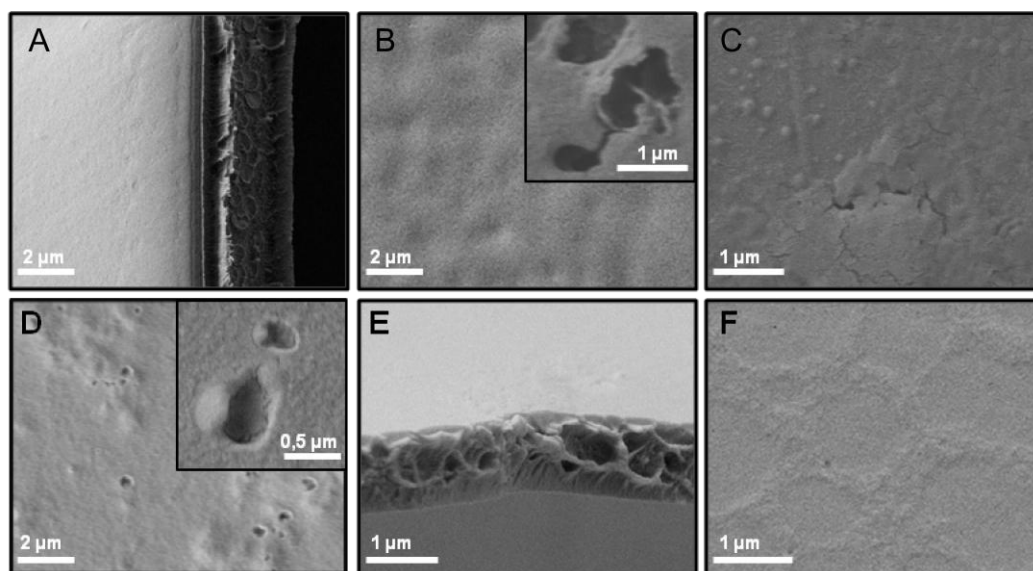


Abb. 3.14: REM-Aufnahmen verschiedener eADF4(C16) Filme. A-C: HFIP-Filme nachbehandelt mit Methanol abs. (A), 1 M Kaliumphosphatlösung (B) oder 70 % Methanol (C); D: Methanol (abs.)-behandelter Ameisensäure-Film; E und F: unbehandelte Filme aus wässriger Lösung. Die Dicke der Filme betrug dabei 1-2 μm (s. A und E).

Unbehandelte Filme aus HFIP stellen sich glatt und ohne erkennbare Oberflächenstruktur dar, was sich auch durch Behandlung mit Methanol nicht signifikant ändert. Im Querschnitt sind sowohl Blaseneinschlüsse als auch geschichtete Strukturen erkennbar (A). Nach Behandlung mit Kaliumphosphat (B) treten vermehrt Vertiefungen und Löcher mit Durchmessern bis zu 0,5-1 μm auf. 70 % Methanol (C) hingegen führt zu einer inhomogenen Strukturierung mit regionalen Unterschieden. Bei Filmen aus Ameisensäure hingegen sind sowohl vor also auch nach Methanol-Behandlung viele Löcher bzw. Vertiefungen zu sehen (D), welche möglicherweise durch Aufplatzen von eingeschlossenen Lösungsmittel-Blasen entstehen. REM-Aufnahmen von Filmen aus wässriger Lösung (wL) zeigen eine teilweise glatte Oberfläche (E), aber auch unebene Bereiche (F). Die für HFIP-Filme beschriebenen Effekte unterschiedlicher Nachbehandlungen treffen qualitativ auch für aus Ameisensäure und wL gegossene Filme zu (s. Anhang, Kapitel 10.2).

Zur detaillierteren Analyse der Oberflächentopographie wurden die Filme mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) untersucht (Abb. 3.15). Neben einer qualitativen Beurteilung der Topographie wurden die Aufnahmen zur Bestimmung der mittleren Rauheit R_a sowie der Rautiefe verwendet (Abb. 3.16). R_a entspricht dabei dem arithmetischen Mittel der Abweichung jedes einzelnen Messpunktes von der Mittellinie, wohingegen die Rautiefe ein Maß für die maximale Rauheit darstellt.

Generell zeigen alle Filme in den gewählten Ausschnitten von 10 μm x 10 μm eine gewisse Strukturierung ihrer Oberfläche, welche sich aus homogenen Flächen im nm-Bereich

zusammensetzt (Abb. 3.15). Dementsprechend steigt die Rauheit mit der analysierten Fläche an (Abb. 3.16). Übereinstimmend mit den REM-Aufnahmen weisen auch hier unbehandelte Filme aus HFIP mit einer Mittelrauheit von 2 nm (bestimmt über $25 \mu\text{m}^2$) die glatteste Oberfläche auf, wobei die Rautiefe etwa 20 nm beträgt. Ihre leicht wellige Struktur geht durch Methanol abs.-Behandlung in eine homogenere Oberfläche mit ähnlicher oder leicht erhöhter Rauheit über (Abb. 3.15). Eine Behandlung mit Phosphatlösung oder 70 % Methanol führt, wie schon im REM beobachtet, auch auf dieser Größenskala zu einer Zunahme der Rauheit, die bei der Alkoholbehandlung besonders stark ausgeprägt ist und eine mittlere Rauheit R_a von 17 nm ergab. Damit einher geht ein Anstieg der Rautiefe auf das 15-fache des unbehandelten Films.

In den ansonsten glatten Ameisensäure-Filmen (unbehandelt) mit Rauheitswerten vergleichbar zu unbehandelten HFIP-Filmen wurden Löcher bzw. Vertiefungen beobachtet. Mit Durchmessern von 0,2-1 μm entsprechen sie den bereits mittels REM detektierten Strukturen. Ihre Tiefe betrug etwa 50-70 nm. Durch Methanol-Behandlung nimmt R_a auf etwa 5 nm zu und die Oberfläche erscheint welliger.

Um zu überprüfen, ob die starke Aufrauung der Filmoberfläche bei Behandlung mit Kaliumphosphat und besonders 70 % Methanol (s. HFIP-Filme) auf das darin enthaltene Wasser zurückzuführen sein könnte, wurden Ameisensäure-Filme, die im Gegensatz zu HFIP-Filmen *per se* unlöslich in Wasser sind, mit Wasser inkubiert und nach anschließender Trocknung analysiert. Auch hier zeigt sich eine starke Zunahme der Rauheit auf > 40 nm (Abb. 3.15, Abb. 3.16). Möglicherweise führt das Wasser zu ungleichmäßigem Quellen der Filme oder erlaubt lokale Umlagerungen der Moleküle. Überschichtung bereits Methanol-behandelter Filme mit Wasser resultierte dagegen nur in einer geringen Zunahme der Rauheit (Abb. 3.16).

AFM-Aufnahmen von wL-Filmen weisen stark unterschiedliche Ergebnisse auf. Die Filme erscheinen teils ähnlich glatt wie die aus den organischen Lösungsmitteln, weisen an anderen Stellen aber eine stark gewellte Oberfläche mit der höchsten beobachteten Rauheit auf. Hierbei handelt es sich vermutlich um die ebenfalls im REM detektierten aufgerauten Bereiche. Auch nach Behandlung mit reinem Methanol bleiben Bereiche unterschiedlicher Rauheit detektierbar.

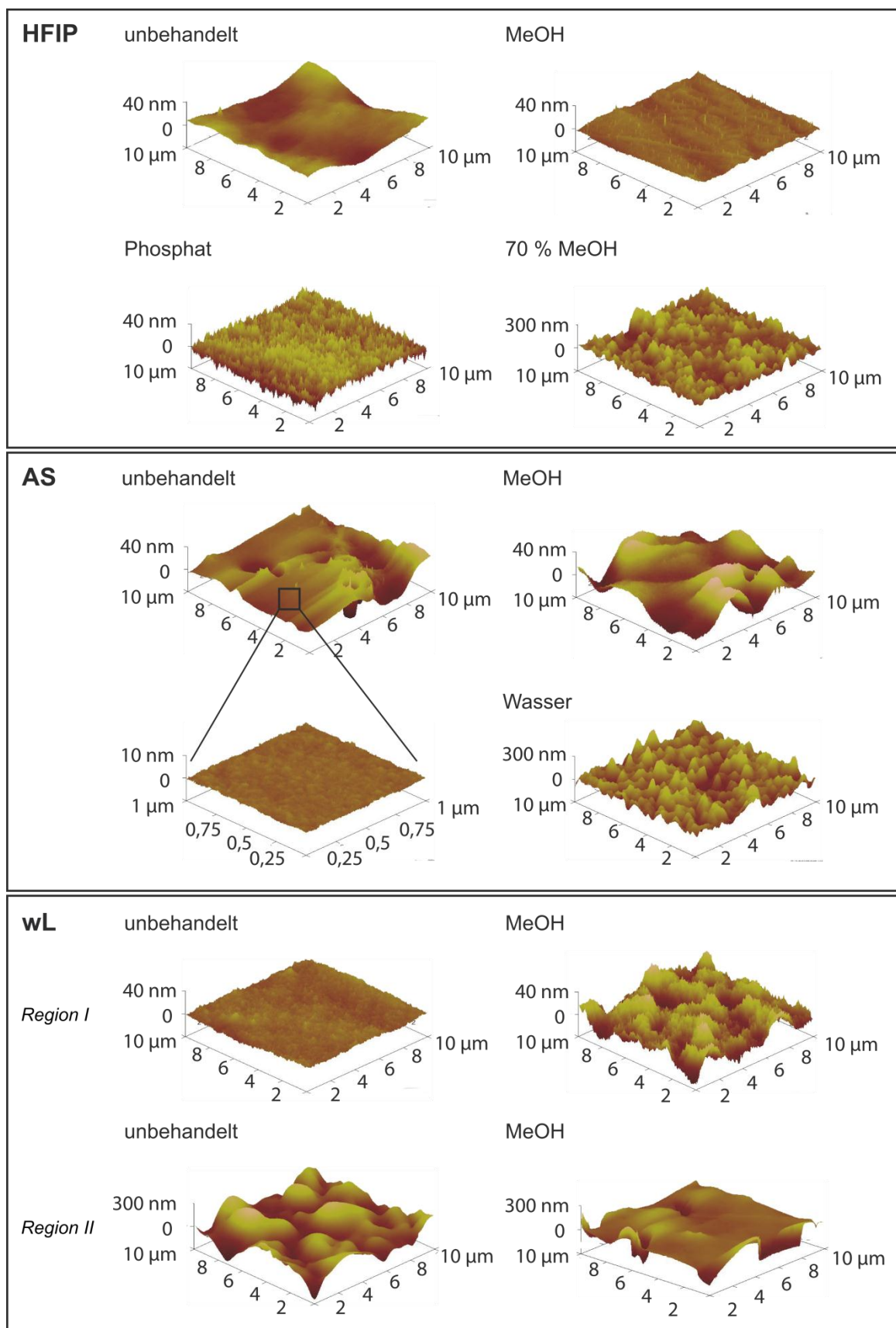


Abb. 3.15: Einfluss verschiedener Lösungsmittel und Nachbehandlungsmethoden auf die Topographie von aus HFIP, Ameisensäure (AS) und wässriger Lösung (wL) gegossenen eADF4(C16) Filmen. Gezeigt sind repräsentative AFM-Aufnahmen mit 1 bzw. 10 μm Kantenlänge. Alle Messungen wurden an Filmen nach Trocknung und Lagerung bei 30 % LF im *tapping mode* durchgeführt.

Die Rautiefe folgt insgesamt bei allen Proben den Trends der Mittelrauheit R_a und variiert zwischen ~ 20 nm bei unbehandelten HFIP-Filmen und 400-500 nm bei mit Wasser behandelten Ameisensäure-Filmen sowie Filmen aus wässriger Lösung.

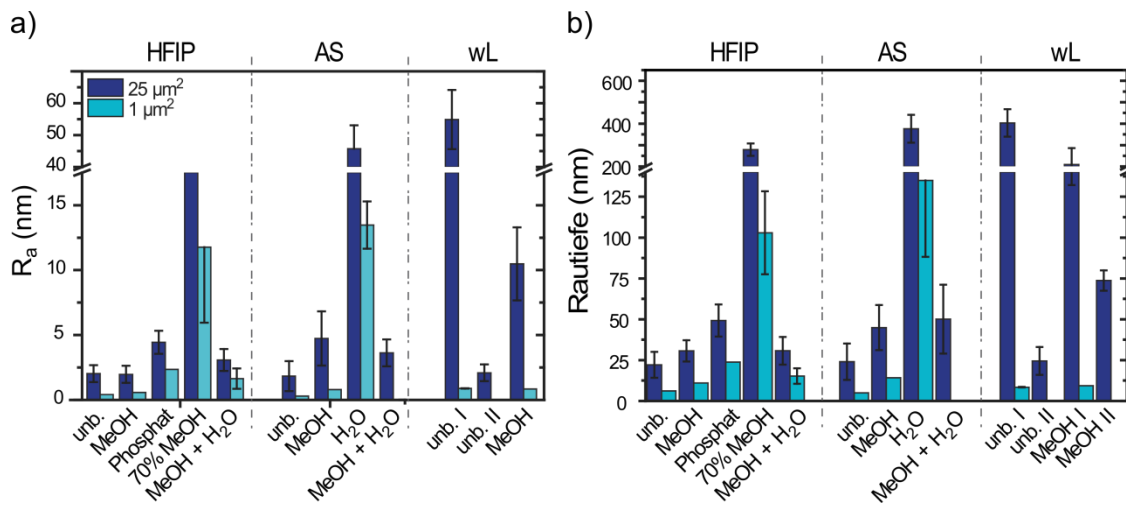


Abb. 3.16: Mittelrauheit R_a (a) und Rautiefe (b) von eADF4(C16) Filmen in Abhängigkeit des Lösungsmittels und der Nachbehandlung. Beide Parameter wurden aus AFM-Aufnahmen der jeweiligen Filme über eine Fläche von $1 \mu\text{m}^2$ (hellblau) bzw. $25 \mu\text{m}^2$ (dunkelblau) ermittelt, wobei die Werte aus stichprobenartig aufgenommenen Aufnahmen gemittelt wurden. (unb.: unbehandelt, MeOH: Methanol abs.; I und II: stark unterschiedliche Bereiche auf wL Filmen)

3.1.4.2 Benetzbarkeit/Hydrophobizität

Die Hydrophobizität der Filmoberflächen wurde über Messung ihrer Benetzbarkeit mit Wasser bestimmt. Kontaktwinkel zwischen Oberfläche und Wassertropfen von $\geq 90^\circ$ gelten dabei als hydrophob, während hydrophile Oberflächen durch kleinere Kontaktwinkel charakterisiert sind. Methanol-behandelte Filme variieren in ihrem Kontaktwinkel je nach verwendetem Lösungsmittel. Mit einem Messwert von $38,4^\circ \pm 6,9^\circ$ (HFIP) bzw. $48,2^\circ \pm 5,8^\circ$ (wL) sind HFIP- und wL-Filme als hydrophil einzuordnen, während Ameisensäure-Filme mit $65,7^\circ \pm 2,0^\circ$ etwas hydrophober sind (Tabelle 3.7). Vor der Behandlung ergaben Ameisensäure-Filme einen leicht geringeren Messwert ($56^\circ \pm 3^\circ$), ebenso wie wL-Filme ($43^\circ \pm 5^\circ$). Allerdings kann bei Filmen aus wässriger Lösung nicht ausgeschlossen werden, dass die Kontaktwinkel-Messung dadurch beeinträchtigt wird, dass sich die Filme teilweise in Wasser lösen. HFIP-Filme konnten dementsprechend gar nicht ohne Nachbehandlung untersucht werden. 70 % Methanol und Ethanol führten genau wie Kaliumphosphat bei allen Filmen zu einer starken Verringerung des Messwertes auf 11° bis 30° . Die Messwerte schwankten dabei allerdings stark, da der abgesetzte Tropfen meist nicht stabil war, sondern sich schnell auf dem Film verbreiterte. Daraus kann geschlossen werden, dass die Filmoberflächen stark hydrophil sind. Jedoch ist auch die Oberflächentopographie dieser Filme soweit verändert (s. o.), dass kein direkter Vergleich mit den anderen Filmen möglich

ist. Insgesamt zeigten alle untersuchten Filme einen deutlich kleineren Kontaktwinkel als die Polystyrol-Oberfläche selbst ($89,4^\circ \pm 1,1^\circ$). ~12

Tabelle 3.7: Kontaktwinkel von Wasser (H_2O_{MQ}) auf verschiedenen eADF4(C16)-Filmen (0,15 mg Protein/cm², gegossen auf Polystyrol (Petrischale)).

Nachbehandlung	HFIP	Ameisensäure	wäss. Lösung
<i>unbehandelt</i>	n.b.	$56,0^\circ \pm 3,0^\circ$	$(43,5^\circ \pm 4,6^\circ)$
<i>MeOH (abs.)</i>	$38,4^\circ \pm 6,9^\circ$	$65,7^\circ \pm 2,0^\circ$	$48,2^\circ \pm 5,8^\circ$
<i>MeOH (70%)</i>		~ 11-20°	
<i>Kaliumphosphat (1 M)</i>		~ 12-30°	

3.2 Modifizierung und Funktionalisierung von eADF4(C16)

3.2.1 Herstellung und Charakterisierung von Cystein-Varianten von eADF4(C16)

Zur Erweiterung des Einsatzspektrums von auf eADF4(C16) basierenden Materialien ist eine Funktionalisierung mit externen Effektormolekülen von großem Interesse. Um einerseits eine schnelle und einfache Modifikation des Proteins mit unterschiedlichsten Molekülen zu ermöglichen, dabei aber andererseits die Position und Quantität der Modifikation genau kontrollieren zu können, wurde auf molekularbiologischem Weg ein Cystein in eADF4(C16) eingebracht. Da das Protein ursprünglich keine Thiole enthält, stellt die Thiolgruppe des eingebrachten Cysteins eine neue, spezifische Kopplungsstelle dar.

3.2.1.1 Design, Expression und Reinigung

Konzeption und Klonierung

Zwei Strategien wurden verfolgt, um jeweils ein Cystein in die Primärsequenz von eADF4(C16) zu integrieren. In dem ersten Ansatz wurde ein Cystein-haltiges Modul C* generiert, in dem das Serin des ursprünglichen C-Moduls an Position 25 durch Cystein ersetzt wurde (Abb. 3.17). Durch Anfügen dieses Moduls am Amino- bzw. Carboxyterminus von eADF4(C16) ergaben sich die nun aus insgesamt 17 Modulen bestehenden Proteine C*C16 bzw. C16C* (s. Anhang, Kapitel 10.5).

Der zweite Ansatz bestand darin, das Cystein außerhalb des C-Moduls zu platzieren. Dafür wurde es in eine 14 Aminosäuren umfassende Sequenz (*tag*) integriert (Abb. 3.17), welche im Folgenden als *ntag*^{Cys} bezeichnet wird, da sie am aminoterminalen Ende des Proteins angefügt wurde. Das daraus resultierende Protein wurde als *ntag*^{Cys}C16 bezeichnet.

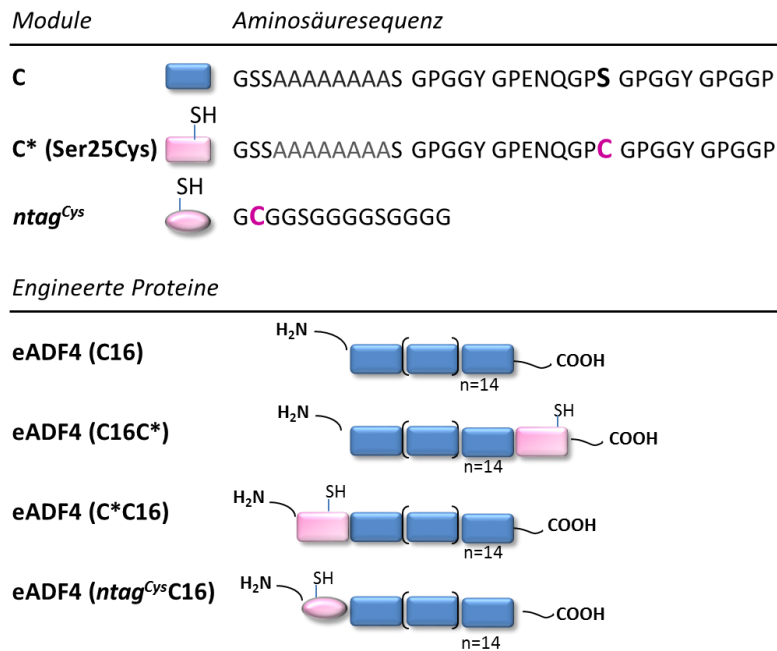


Abb. 3.17: Cystein-haltige Varianten von eADF4(C16). Um jeweils ein Cystein in die Sequenz des Cystein-freien eADF4(C16) einzubringen, wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurde das Modul C* generiert, in welchem Ser 25 in der ursprünglichen Sequenz zu Cys mutiert wurde. In einem zweiten Ansatz wurde ein Cystein in einer 14 Aminosäuren umfassenden Sequenz integriert („ntag^{Cys}“). Sowohl C* als auch ntag^{Cys} wurden als eigenständige Module entweder an das amino-oder carboxyterminale Ende der Sequenz von eADF4(C16) angebracht. (nach Spiess *et al.*, 2010b mit freundlicher Genehmigung des Verlags Royal Society of Chemistry)

Die für das Modul C* codierende DNA-Sequenz wurde mittels Mutagenese-PCR unter Verwendung der Primer pCSmut-fwd und pCS-C^{S25C}-rev (s. Kapitel 2.1.1) hergestellt. Als Matrize diente das Plasmid pAZL(C), welches die für ein C-Modul codierende DNA-Sequenz enthält (Huemmerich *et al.*, 2004a). Die für ntag^{Cys} codierenden DNA-Sequenz wurde durch Hybridisierung zweier komplementärer, synthetisierter Oligonukleotide (ntag^{Cys}-fwd und ntag^{Cys}-rev, s. Kapitel 2.1.1.1) erzeugt. Diese waren so konzipiert, dass an beiden Enden komplementäre Überhänge zum geschnittenen Zielvektor vorlagen. Nach Klonierung des jeweiligen Konstrukts in den Vektor pAZL standen somit für beide Strategien DNA-Sequenzen zur Verfügung, die in einem etablierten Klonierungssystem zur nahtlosen Oligomerisierung (Huemmerich *et al.*, 2004a) eingesetzt werden konnten.

Hintergrund beider Strategien war, funktionelle Charakteristika von eADF4(C16), wie beispielsweise seine Assemblierungseigenschaften, möglichst nicht zu beeinträchtigen. So wurde für die erste Strategie der Austausch S25C aufgrund der chemischen und sterischen Ähnlichkeit beider Aminosäuren gewählt. Zudem zeigte ein Vergleich der Hydrophazitätsblots nach Kyte und Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982) für die jeweiligen Proteine an dieser Stelle die geringsten Veränderungen (s. Anhang, Kapitel 10.5).

Mittels Strategie 2 ($ntag^{Cys}$) sollte das Cystein als Kopplungsstelle an einer flexiblen und möglichst nicht mit der Ausbildung hydrophober (intermolekularer) Wechselwirkungen interferierenden Stelle bereitgestellt werden und ist daher durch einige Aminosäuren, bestehend aus Glycin- und Serinresten, von der ursprünglichen Sequenz von eADF4(C16) getrennt.

Proteinproduktion und -Reinigung

Die Expression der mittels Sequenzierung verifizierten Konstrukte erfolgte in einem Bioreaktor im Expressionsstamm *E. coli* HMS174(DE3). Alle drei rekombinanten Proteine C*C16, C16C* sowie $ntag^{Cys}$ C16 konnten weitgehend nach der für eADF4(C16) entwickelten Reinigungsstrategie gereinigt werden. Die Ausbeute betrug dabei 1,2-2,3 mg/g Biomasse, wobei von $ntag^{Cys}$ C16 die höchsten Mengen erhalten wurden. Die Reinheit und Identität der Proteine konnte mittels SDS-PAGE, Westernblot (Abb. 3.18) und Massenspektrometrie (s. Kapitel 10.3, Abb. 10.5) überprüft und bestätigt werden.

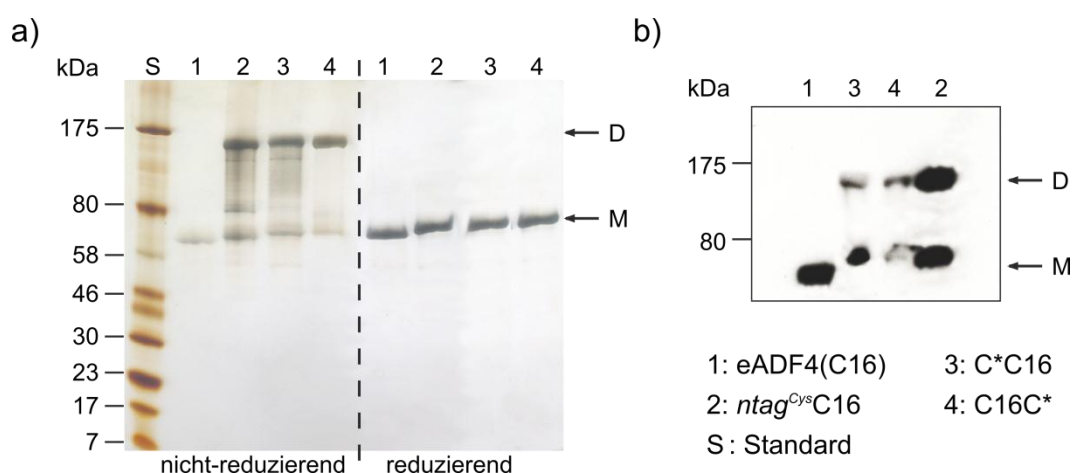


Abb. 3.18: Analyse der gereinigten Cys-Varianten von eADF4(C16) mittels SDS-PAGE (a) und WesternBlot (b). (a) Die Proteine wurden mit bzw. ohne Zusatz von β -Mercaptoethanol inkubiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend einer Silberfärbung unterzogen. (b) Immunoblot der Proteine unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Die Detektion erfolgte über den auf dem Expressionsvektor pET21a kodierten T7-tag, welcher am Aminoterminus der Proteine lokalisiert ist. M: Monomer, D: Dimer

Beim Vergleich mit dem aufgetragenen Größenstandard in der SDS-PAGE fiel auf, dass die Laufstrecke der Proteine nicht ihrem theoretischen Molekulargewicht von 48,5 kDa ($ntag^{Cys}$ C16) bzw. 50,6 kDa (C*C16 und C16C*) entspricht (s. Tabelle 3.8). Dieses Phänomen tritt jedoch auch bei eADF4(C16) auf, welches eine Molmasse von 47,7 kDa besitzt, und gründet sich vermutlich auf dessen spezielle Aminosäurezusammensetzung. Die massenspektrometrische Analyse bestätigte zudem in allen Fällen das erwartete Molekulargewicht (s. Anhang, Abb. 10.5). Bei Analyse unter nicht-reduzierenden Bedingungen zeigte sich bei allen drei Cystein-Varianten eine zusätzliche Proteinbande, die dem jeweiligen Dimer entspricht.

3.2.1.2 Analyse der Sekundärstruktur

Um zu überprüfen, ob die Veränderungen der Primärstruktur von eADF4(C16) dessen Sekundärstruktur beeinflusst, wurden die Cystein-Varianten CD-spektroskopisch untersucht. Die Spektren aller drei Proteine (gelöst in 10 mM Tris-HCl, pH 8) gleichen dem von eADF4(C16). Die auftretenden Unterschiede in der absoluten minimalen molaren Elliptizität zwischen 198-203 nm (Abb. 3.19 a) spiegeln vermutlich Messartefakte wider. Somit liegen auch diese Proteine größtenteils in ungeordneter bzw. Polyprolin II-Konformation vor (s. Kapitel 3.1.1.1). Da Abb. 3.18 die Anwesenheit von Dimeren zeigt, wurden die Proteine zudem in reduziertem Zustand untersucht. Auch hier zeigt sich keine signifikante Änderung des Kurvenverlaufs (Abb. 3.19 b).

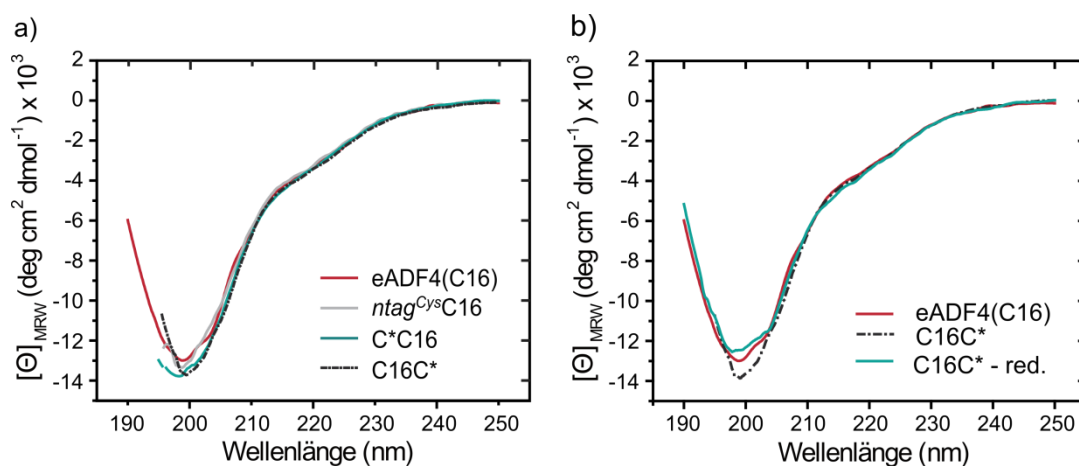


Abb. 3.19: Analyse der Sekundärstruktur Cys-haltiger Varianten von eADF4(C16) in wässriger Lösung (10 mM Tris-HCl pH 8) mittels Fern-UV CD-Spektroskopie. (a) Vergleich aller Cys-Varianten zum Originalprotein eADF4(C16). (b) Vergleich von nicht-behandeltem sowie reduziertem (red.) Protein, exemplarisch gezeigt für C16C*. (nach Spiess *et al.*, 2010b mit freundlicher Genehmigung des Verlags Royal Society of Chemistry)

3.2.1.3 Charakterisierung des Dimerisierungsverhaltens

Wie bereits in Abb. 3.18 zu sehen ist, lagen die Cystein-haltigen Proteine nach Reinigung teilweise als Disulfid-verbrückte Dimere vor. Zur genaueren Analyse wurden die Proteine entweder ohne weitere Zusätze sowie nach Reduktion mit TCEP mittels Größenausschluss-Chromatographie (SEC) aufgetrennt (Abb. 3.20). Als Referenz wurde eADF4(C16) aufgetragen, welches zum direkten Vergleich ebenfalls mit dem Reduktionsmittel versetzt worden war. Die Detektion erfolgte neben UV-Absorptionsmessung mittels statischer sowie dynamischer Lichtstreuung. Statische Lichtstreuung ermöglicht eine Bestimmung der absoluten molaren Masse ohne Verwendung von Größenstandards sowie des Trägheitsradius, während mit dynamischer Lichtstreuung der hydrodynamische Radius der Probe ermittelt wird.

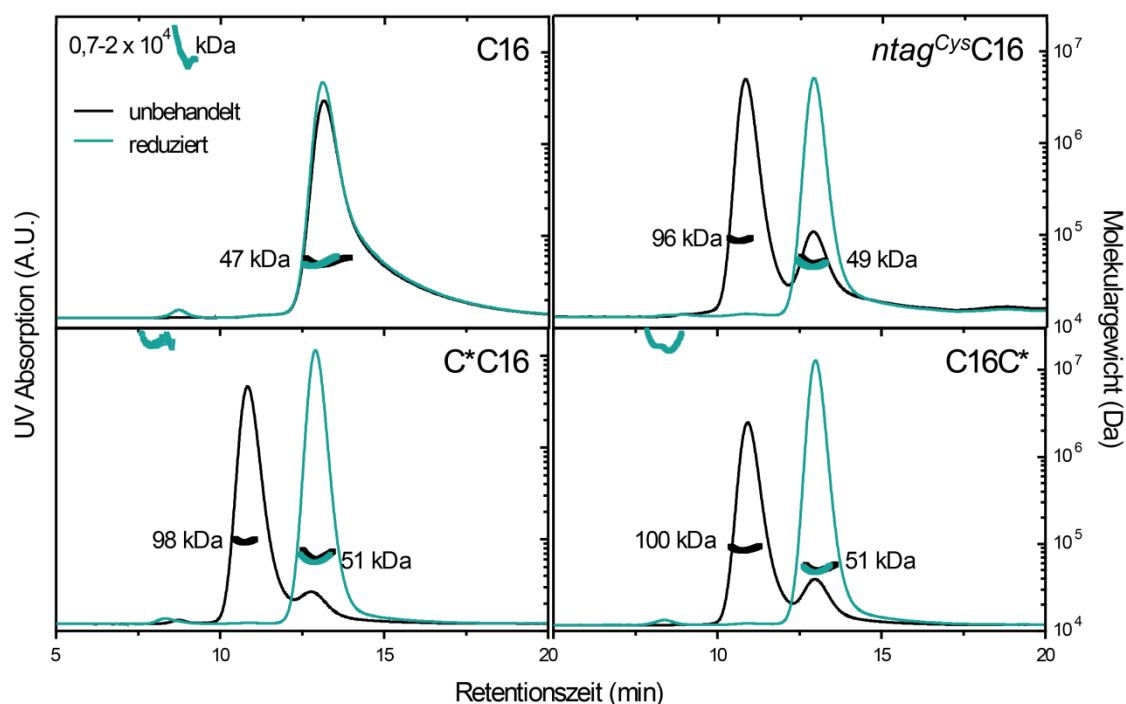


Abb. 3.20: Analyse von eADF4(C16) sowie seiner Cys-Varianten mittels Größenausschlusschromatographie. Die Proben wurden ohne bzw. nach Reduktion mit TCEP auf eine Superdex S-200 10/300 HR aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 10 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl verwendet, die Laufgeschwindigkeit betrug 0,9 ml/min. Dünne Linien repräsentieren das UV-Absorptionssignal, dicke Linien das aus statischer Lichtstreuung ermittelte Molekulargewicht. Aus den Messungen bestimmte Werte sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst.

In allen Proben wurde nach einer Retentionszeit von 13 min ein Peak detektiert. Die ermittelten zugehörigen molaren Massen und der Vergleich mit eADF4(C16) zeigen, dass es sich dabei um monomeres Protein handelt (Tabelle 3.8). In den nicht-reduzierten Proben der Cystein-haltigen Proteine zeigt sich zusätzlich ein Peak nach 11,5 min, welcher dem jeweiligen Dimer entspricht und in den reduzierten Proben vollständig fehlt. Teilweise ist eine weitere minimale Absorption nach einer Retentionszeit von 7 min zu erkennen. Das berechnete Molekulargewicht von $0,7-2 \times 10^7$ Da deutet darauf hin, dass es sich hier um höhere oligomere Proteinspezies handelt. Da diese Signale jedoch auch bei eADF4(C16) auftraten, scheint es sich dabei nicht um Cystein-abhängige Spezies zu handeln. Zusätzlich trat bei eADF4(C16) ein Tailing des Signals auf, was vermutlich auf verkürzte oder proteolytisch bedingte Proteinfragmente zurückzuführen ist.

Aus dem Verhältnis der Flächen der jeweiligen Absorptionspeaks wurde der Anteil an Monomer bzw. Dimer für die einzelnen Proteine bestimmt (Tabelle 3.8). *Ntag^{Cys}C16* besitzt in nativem Zustand mit ca. 31 % den höchsten Monomer-Anteil, während er bei C*C16 und C16C* etwas niedriger (17-20 %) liegt. Durch Zugabe von TCEP konnten alle drei Proteine vollständig monomerisiert werden.

Die Bestimmung des Trägheitsradius R_g aus statischer Lichtstreuung ist erst ab einer gewissen Partikelgröße möglich, wobei die Grenze (des hier verwendeten Systems) bei etwa 10 nm

liegt. Für die Monomere konnte daher kein verlässlicher Wert erhalten werden. Im Fall der Proteindimere ergaben sich Werte zwischen 12 und 13 nm (Tabelle 3.8). Der hydrodynamische Radius R_h von eADF4(C16) beträgt 3-5 nm, wobei der Fehler von ca. 20 % vermutlich auf die niedrige Proteinkonzentration zurückzuführen ist. Dimere Proteine ergaben einen R_h von etwa 6 nm. Aus dem Verhältnis von R_g zu R_h („Formfaktor“) können Informationen über die Molekülform erhalten werden. So weisen gefüllte Kugeln typischerweise einen Formfaktor von 0,77, Hohlkugeln von ~1, und stabförmige Moleküle von 1,7 auf (Rizos *et al.*, 2003; Adolphi & Kulicke, 1997). Für die Dimere der Cys-Varianten von eADF4(C16) ergibt sich ein Formfaktor von ca. 2. Obwohl die jeweiligen Werte eine gewisse Fehlerbreite aufweisen, kann daraus auf eine elongierte, stäbchenartige Molekülgeometrie geschlossen werden.

Tabelle 3.8: Übersicht über das theoretische Molekulargewicht, Monomer-Dimer-Verteilung und Dimergröße der Cys-Varianten von eADF4(C16). Die jeweiligen Werte wurden aus Analyse mittels SEC kombiniert mit statischer und dynamischer Lichtstreuung ermittelt (Abb. 3.20). In Klammern ist der jeweilige Fehler angegeben.

Protein	Molekulargewicht [kD]		Anteil [%]		Größe (Dimer)		
	Monomer	Dimer	Monomer	Dimer	R_h [nm]	R_g [nm]	Formfaktor $\rho=R_g/R_h$
C16	47,7	-	100	0	4 (20%) (Monomer)		
<i>ntag</i> ^{Cys} C16	48,5	97	31	69	6,4 (10%)	12,9 (1%)	2,01
C*C16	50,6	101,2	17	83	6,1 (9%)	12,4 (1%)	2,03
C16C*	50,6	101,2	20	80	6,2 (8%)	12,3 (2%)	1,98

Bestimmung des Redoxpotentials

Da das Cystein in den drei verschiedenen Proteinen jeweils in anderer Umgebung platziert ist, wurde zusätzlich das Redoxpotential der jeweiligen Disulfid-Bindungen/Cystine bestimmt. Im Zuge der initialen Charakterisierung von rekombinant hergestellten Spinnenseidenproteinen wurde bereits eine Methode zur semi-quantitativen Bestimmung des Redoxpotentials – hier von den Disulfid-verbrückten nicht-repetitiven Regionen NR3 und NR4 – entwickelt (Huemmerich, 2004). Analog dazu wurden die Proteine *ntag*^{Cys}C16, C*C16 und C16C* in einem auf DTT basierenden Redox-Puffersystem bei verschiedenen Redoxpotentialen E' (Potential bei pH 7) inkubiert (s. Kapitel 2.4.4). Aus der Nernst-Gleichung abgeleitet entspricht das Potential derjenigen Lösung, in der die Proteine zu gleichen Teilen als Monomer und Dimer vorlagen, dem Standard-Redoxpotential ihres Cystins. Der Einfluss

der Cystine der eADF4(C16)-Varianten auf das Redoxpotential wurde aufgrund der geringen Konzentration (ca. 10 μ M) vernachlässigt.

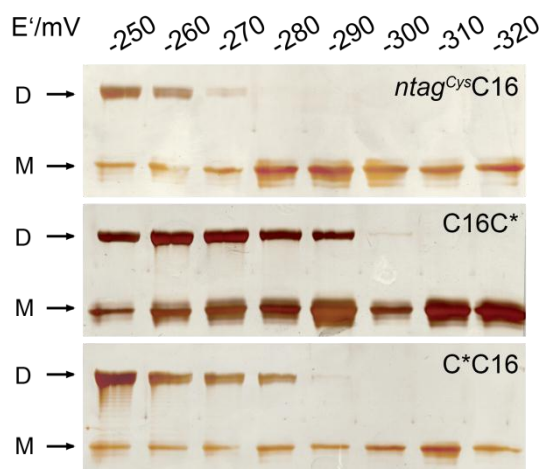


Abb. 3.21: Redox titration von Cys-Varianten von eADF4(C16). Die Proteine ($c = 0,5$ mg/ml) wurden 1 h in Lösungen mit verschiedenen Redoxpotentialen (eingestellt über das Mischungsverhältnis von DTT_{ox} zu DTT_{red} in 100 mM MOPS pH 7, 1 mM EDTA) inkubiert. Nach Carboxymethylierung wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt. Das Potential der Lösung, in der die Proteine zu gleichen Teilen als Monomer und Dimer vorliegen, entspricht dem Redoxpotential ihres Cystins. (nach Spiess *et al.*, 2010b, mit freundlicher Genehmigung des Verlags Royal Society of Chemistry)

Das so ermittelte Potential liegt bei $ntag^{Cys}C16$ bei -250 bis -260 mV, während es bei C16C* und C*C16 bei negativeren Werten zwischen -270 und -280 mV liegt (Abb. 3.21). Dieser Unterschied ist vermutlich die Ursache für den beobachteten höheren Monomeranteil in $ntag^{Cys}C16$.

3.2.2 Kopplung in Lösung

Die Modifikation der eADF4(C16)-Varianten sollte über Kopplung an die Thiolgruppe des eingebauten Cysteins erfolgen. Hierzu wurde die spezifische Reaktion mit Maleimid-Gruppen eingesetzt, die bei neutralem pH abläuft. Da für diese Reaktion freie Thiole notwendig sind, mussten die zum Großteil in Disulfid-verbrücktem Zustand vorliegenden Cys-Proteine zunächst reduziert werden. Um eine möglichst quantitative Reaktion zu gewährleisten, wurden die optimalen Bedingungen der Reduktion empirisch ermittelt. Einstündige Inkubation der Proteine mit 10-fachem Überschuss an Reduktionsmittel erwies sich als ausreichend. In einer (unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführten) SDS-PAGE wurde nur Monomer detektiert. Zudem ergab die Reaktion des vom Reduktionsmittel abgetrennten Proteins mit Ellmans Reagens durchschnittlich 0,95 mol freies Thiol pro mol Protein. Als Reduktionsmittel wurde TCEP gewählt, da es nicht die folgende Kopplungsreaktion beeinträchtigt und somit nicht entfernt werden muss, was aufgrund der beobachteten schnellen Wiederausbildung von Disulfidbrücken bei Entfernung des Reduktionsmittels die Kopplungseffizienz erhöht.

3.2.2.1 Kopplung von Fluorescein-Maleimid

Zur Optimierung sämtlicher Parameter wurde zunächst Fluorescein-Maleimid an $ntag^{Cys}C16$ gekoppelt. Bei pH 7 ist die Reaktion zwischen einer Maleimid-Gruppe und Thiolen etwa

1000-fach gegenüber der Reaktion mit primären Aminen (welche bei diesem pH-Wert protoniert vorliegen) bevorzugt, so dass durch Einstellen des pH-Wertes die Spezifität der Reaktion beeinflusst werden kann. Sowohl die Reduktion des Proteins als auch die anschließende Kopplung wurde daher in 20 mM HEPES pH 7 durchgeführt. Nach 2 h Inkubation bei RT wurde das Protein durch Zugabe von 1 M Kaliumphosphat-Puffer quantitativ präzipitiert. Wie bei eADF4(C16) bilden sich dadurch stabile Mikrokugeln mit hohem β -Faltblatt-Anteil (Slotta *et al.*, 2008; Wohlrab, 2010). Diese können durch mehrmaliges Waschen oder durch Dialyse von nicht-gebundenem Fluorophor getrennt werden. Analyse des gekoppelten Proteins mittels SDS-PAGE, Massenspektrometrie (s. Anhang, Abb. 10.6) sowie HPLC unter Benutzung einer C4-Umkehrphasensäule (Abb. 3.22) verifizierte die kovalente Bindung des Fluoresceins an $ntag^{Cys}$ C16. So wurde nach 14,9 min ein Fluoreszenzsignal erhalten, welches durch Vergleich mit den UV-Signalen $ntag^{Cys}$ C16 zugeordnet werden kann. Das Vorhandensein von übrigem, freiem Fluorophor in dem gereinigten Protein konnte mittels HPLC-Analyse ausgeschlossen werden (Abb. 3.22), da kein entsprechendes Signal (bei 17,7 min) auftrat. Die Kopplungseffizienz wurde über UV-Vis-Absorptionsmessung der Lösung bei 276 nm sowie 493 nm bestimmt (s. Kapitel 2.4.6) und lag bei 70-90 %.

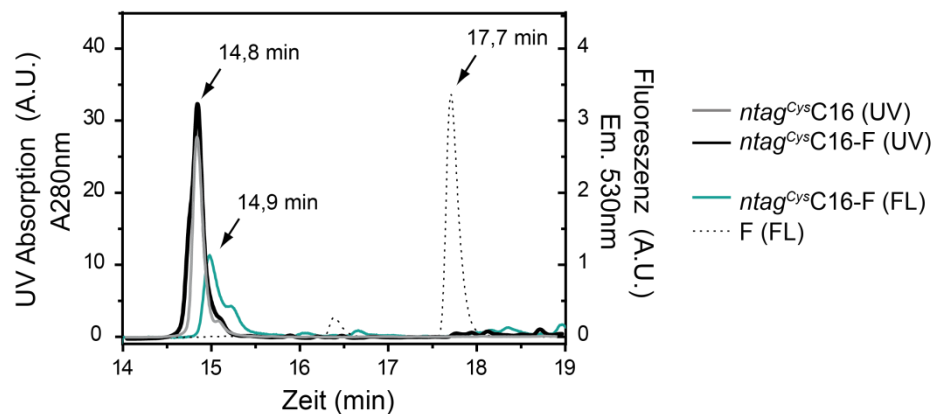


Abb. 3.22: Analyse der Kopplung von Fluorescein-Maleimid (F) an $ntag^{Cys}$ C16 mittels C4-Umkehrphasensäule. Gezeigt sind die UV-Absorption bei 280 nm (UV) sowie die detektierte Fluoreszenz (FL) (Ex. 490 nm, Em. 530 nm). $ntag^{Cys}$ C16-F: gekoppeltes Protein, F: freies Fluorescein-Maleimid. Der Detektorshift zwischen UV- und Fluoreszenzsignal ist durch den instrumentellen Aufbau bedingt. (nach Spiess *et al.*, 2010b, mit freundlicher Genehmigung des Verlags Royal Society of Chemistry)

3.2.2.2 Modifikation mit zyklischem RGD-Peptid c(RGDfK)

Eine Modifikation mit RGD findet häufig Anwendung zur spezifischen Verbesserung der Zelladhäsion (vgl. 3.3.1.4) (Hersel *et al.*, 2003). Die Aminosäurefolge aus Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) wurde als ein wichtiges Erkennungsmotiv zur Bindung von Integrinen in der extrazellulären Matrix (ECM) identifiziert (Pierschbacher & Ruoslahti, 1984; Ruoslahti,

1996). Das hier verwendete zyklische RGD-Peptid c(RGDfK) wurde speziell auf die Interaktion mit Integrinen des Typs $\alpha_v\beta_3$ optimiert (Kantlehner *et al.*, 2000) und freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kessler (TU München) synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Um die spezifische Reaktion mit Thiolen zu ermöglichen, wurde zudem eine Maleimid-Gruppe angefügt, welche über einen starren Linker (SMCC, Abb. 3.23 a) mit dem Peptid verbunden ist. Da keine Antikörper zur Detektion dieses zyklischen Peptids existieren, wurde für erste Experimente zusätzlich Fluorescein angefügt, auf das in weiterführenden Arbeiten verzichtet wurde.

Die Modifikation von *ntag*^{Cys}C16 mit c(RGDfK) erfolgte analog zur Kopplung mit Fluorescein-Maleimid. Hierbei wurde eine Kopplungseffizienz von 75-90 % erzielt. Wiederum konnte die kovalente Kopplung mittels Massenspektrometrie (s. Anhang, Abb. 10.6), SDS-PAGE und HPLC unter Benutzung einer C4-Umkehrphasensäule nachgewiesen werden, wobei der Peak bei 14,8 min (UV) nicht-gekoppeltem Protein entspricht (Abb. 3.23 b). Bei kovalenter Kopplung des RGD-Peptids verschiebt sich das Signal auf 15,1 min (UV) bzw. 15,2 min (FL).

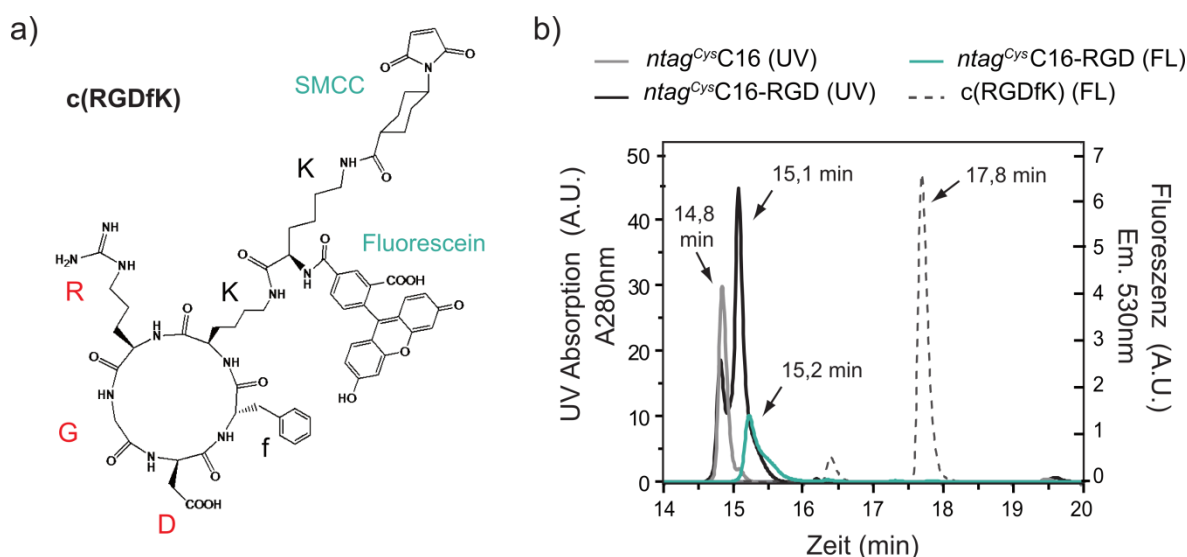


Abb. 3.23: (a) Strukturformel des zyklischen RGD-Peptids c(RGDfK)-Maleimid (zur Verfügung gestellt von AG Prof. Kessler, TU München). Die Aminosäurereste sind dabei durch den Einbuchstabencode dargestellt, wobei Großbuchstaben L- und Kleinbuchstaben D-Aminosäuren kennzeichnen. Eine Maleimid-Funktionalität wurde über den Linker SMCC angebracht. Zur Detektion wurde zusätzlich Fluorescein angefügt. (b) Analyse der Kopplung von c(RGDfK)-Maleimid an *ntag*^{Cys}C16 mittels C4-Umkehrphasensäule. Gezeigt sind die UV-Absorption bei 280 nm (UV) sowie Fluoreszenzsignale (FL) (Ex. 490 nm, Em. 530 nm). *ntag*^{Cys}C16-RGD: gekoppeltes Protein, c(RGDfK): freies RGD-Peptid

3.2.3 Modifikation und Funktionalisierung von Filmen aus Cystein-Varianten von eADF4(C16)

3.2.3.1 Strukturelle Charakterisierung der Filme

Im Folgenden wurde untersucht, ob die für eADF4(C16) bestimmten Charakteristika der Filmbildung sowie der Filme selbst bei Verwendung der Cys-Proteine erhalten bleiben. Es zeigte sich, dass alle drei Proteine zu Filmen prozessiert werden können. Dabei traten keine signifikanten Unterschiede zu eADF4(C16) auf, weder bei der Filmherstellung noch bei der strukturellen Untersuchung der Proteine in den Filmen. Exemplarisch sind FTIR-Spektren von aus HFIP gegossenen Filmen gezeigt (Abb. 3.24). Sie weisen sowohl vor als auch nach Behandlung mit Methanol abs. Charakteristika vergleichbar zu den entsprechenden eADF4(C16)-Filmen auf. Unbehandelte Filme zeigen FTIR-Maxima bei 1654 cm^{-1} und eine Schulter bei 1638 cm^{-1} und bestehen somit vornehmlich aus einer Mischung aus α -Helices und ungeordneten Strukturen. Eine für β -Polyalanin typische Absorption (um 964 cm^{-1}) war nicht zu erkennen. Diese Absorption trat erst nach Methanol-Behandlung auf, welche auch in den Cys-Proteinen die Bildung von β -Faltblatt-Struktur induziert und zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu 1625 cm^{-1} führt (Abb. 3.24 b). Genauso gleichen Filme gegossen aus AS und Puffer denen aus eADF4(C16) (Daten nicht gezeigt).

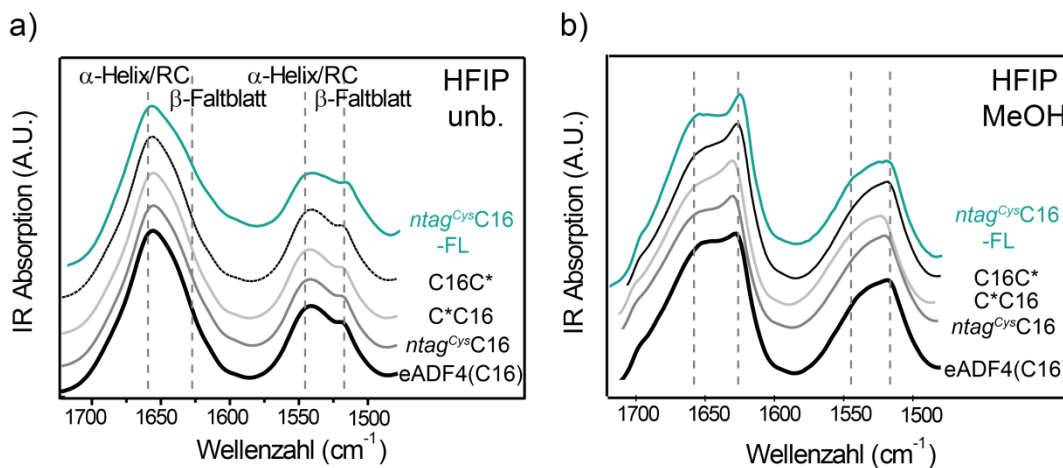


Abb. 3.24: FTIR-Spektren Cys-haltiger Varianten im Vergleich zu eADF4(C16). Gezeigt sind aus HFIP gegossene Filme ohne (a) bzw. mit Methanol-Behandlung (b). ntag^{Cys}C16-FL: mit Fluorescein-Maleimid gekoppeltes ntag^{Cys}C16; RC: random coil.
(nach Spiess *et al.*, 2010b, mit freundlicher Genehmigung des Verlags Royal Society of Chemistry)

Mit Fluorescein modifiziertes ntag^{Cys}C16 bildete Filme aus, die in ihrer Sekundärstruktur denen ohne Fluorescein gleichen (Abb. 3.24). Das kleine, hydrophobe Fluorophor-Molekül scheint daher nicht signifikant die Ausbildung der intra- und intermolekularen Wechselwirkungen des Spinnenseidenproteins zu beeinträchtigen, welche bei Bildung der typischen Filmstruktur auftreten. Im Gegensatz dazu beeinflusst Fluorescein die Bildung von

Hydrogelen aus eADF4(C16) bzw. die Anordnung der darin enthaltenen Nanofibrillen (Schacht & Scheibel, 2011).

Filme aus den Cystein-Varianten entsprachen somit in ihrer Sekundärstruktur denen von eADF4(C16). Auch ihre chemische Beständigkeit gegenüber Wasser und Denaturierungsmitteln war identisch zu eADF4(C16)-Filmen (vgl. Kapitel 3.1.2).

3.2.3.2 Filmmodifikation

Wie in Kapitel 3.2.3.1 beschrieben, können modifizierte Spinnenseiden-Filme prinzipiell durch Assemblierung von in Lösung modifiziertem Protein hergestellt werden. Diese Möglichkeit ist jedoch durch die Art des anzubringenden Moleküls limitiert. Abhängig von der chemischen Natur und der Größe ist eine Wechselwirkung bzw. Beeinträchtigung der natürlichen Proteinassemblierung zu erwarten. Daher wurde die nachträgliche Kopplung bereits gebildeter Filme untersucht. Zusätzlich bietet dies die Option, spezifisch die Filmoberfläche zu modifizieren (wiederum abhängig von den Eigenschaften des zu koppelnden Moleküls) sowie gegebenenfalls die Menge an eingesetzten Effektormolekülen zu minimieren. Die Dichte der funktionellen Gruppen kann zudem durch Herstellung von Blends gesteuert werden.

Um Fragen der grundsätzlichen Reaktion, wie die Zugänglichkeit der Thiole im bereits assemblierten Film, zu klären, wurde zunächst Fluorescein für die Kopplungsreaktion verwendet. Anschließend wurden Filme mit verschiedenen Effektormolekülen modifiziert.

Modifikation mit Fluorescein

Zur Modifikation wurden Filme aus den Cystein-Varianten von eADF4(C16) aus Lösung in HFIP hergestellt und durch Methanol abs.-Behandlung wasserunlöslich gemacht. Die Kopplungsreaktion erfolgte analog zu der in Lösung mit Fluorescein-Maleimid in Anwesenheit von TCEP. Nach einer Inkubationszeit von 2 h wurde nicht gekoppeltes Fluorescein durch mehrmaliges Waschen entfernt. Eine erste qualitative Einschätzung der Kopplung konnte über Aufnahmen der Filme mittels Fluoreszenz-Imager erfolgen. Zur weiteren Analyse wurden die Filme jedoch in 6 M Guanidiniumthiocyanat (GdmSCN) gelöst und anschließend gegen Tris-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8) dialysiert. SDS-PAGE zeigte bei allen drei Cys-Proteinen eine erfolgreiche kovalente Kopplung (Abb. 3.25). Durch spezifische Anregung von Fluorescein in einem Fluoreszenz-Imager zeigten die Cys-Proteine ein Signal auf Höhe des Protein-Monomers, während kein Signal bei der Kontrolle ohne Fluorescein zu sehen ist. Zudem wies eADF4(C16), welches zur Überprüfung der Kopplungsspezifität genutzt wurde, keinerlei Signale auf. Nach anschließender Silberfärbung wurden neben

Protein-Monomer auch Dimere sichtbar. Dies deutet darauf hin, dass ein Großteil der Proteine (vermutlich im Inneren der Filme) nicht für Reduktion bzw. Kopplung zugänglich sind. Da nach der Kopplungsreaktion keinerlei Reduktionsmittel mehr zugesetzt wurde, könnte es sich auch um Dimere handeln, die während der sich anschließenden Dialyse neu gebildet wurden.

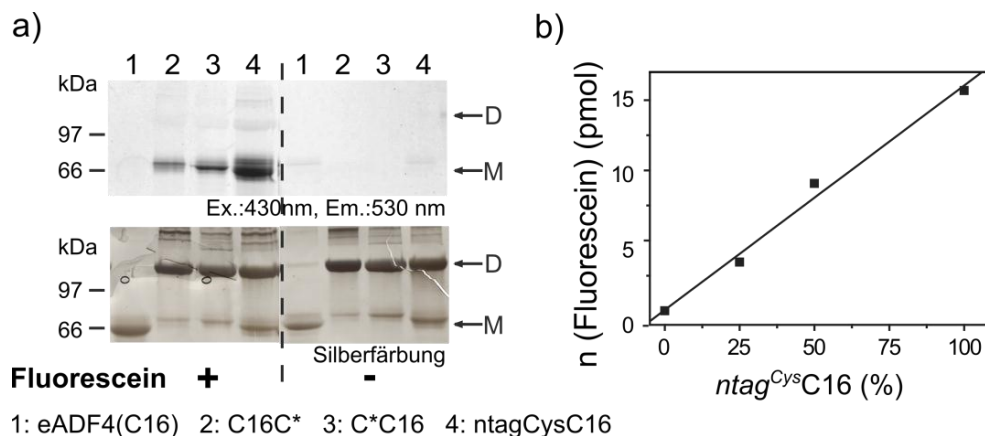


Abb. 3.25: Kopplung von Fluorescein-Maleimid an Filme aus Cystein-Varianten von eADF4(C16). Fluorescein-modifizierte Filme wurden in 6 M GdmSCN gelöst, gegen 10 mM Tris/HCl pH 8 dialysiert und anschließend analysiert. (a) SDS-PAGE: Das Gel wurde im Fluoreszenz-Imager (Ex.: 480 nm, Em.: 530 nm) gescannt und nachfolgend einer Silberfärbung der Proteine unterzogen. (+) mit bzw. (-) ohne gekoppeltes Fluorescein (b) Mittels HPLC-Analyse der gelösten Filme bestimmte Menge an gebundenem Fluorescein pro Film, wobei die Filme aus unterschiedlichen Mischungsverhältnissen aus ntag^{Cys}C16 und eADF4(C16) gegossen waren. Die Stoffmenge an Fluorescein wurde durch Vergleich mit einer Standardgeraden ermittelt. (nach Spiess *et al.*, 2010b, mit freundlicher Genehmigung des Verlags Royal Society of Chemistry)

Eine quantitative Bestimmung des gebundenen Fluoresceins über UV-Absorption war aufgrund der geringen Konzentrationen nicht möglich. Daher wurde zur Quantifizierung Fluoreszenzspektroskopie in Kombination mit einer erstellten Standardgerade eingesetzt (s. Kapitel 2.5.2). Durch Analyse mittels HPLC konnte zudem ein Beitrag von eventuell noch vorhandenem freien Fluorescein ausgeschlossen werden. Für ntag^{Cys}C16 ergab sich ein Wert von 15,7 pmol Fluorescein pro cm² Film (mit ca. 0,5 µm Dicke) (Abb. 3.25 b, 100 %). Bezogen auf die gesamte Proteinmenge im Film entspricht dies etwa 0,004 mol Fluorescein pro mol Protein.

Modifizierung von Filmen mit variierendem Anteil an eADF4(C16) und eines Cys-Proteins (ntag^{Cys}C16) resultierte in steigender Fluorescein-Menge in Abhängigkeit des Anteils an Cys-Protein, wobei ein linearer Zusammenhang beobachtet wurde. Dies stellt einen weiteren Hinweis auf die Spezifität der Reaktion dar und ermöglicht das gezielte Einstellen eines gewünschten Modifikationsgrads (Abb. 3.25 b).

Bei Betrachtung der gekoppelten Filme im konfokalen Fluoreszenzmikroskop zeigte sich diffuse Fluoreszenz im gesamten Film. Da dies auf Diffusion des Fluoresceins in den Film hindeutet, wurden zur weiteren Analyse Diffusionsexperimente an Methanol-behandelten HFIP-Filmen durchgeführt. Hierzu wurden Filme so befestigt, dass sie zwei Lumen einer

Kammer voneinander trennten (Abb. 3.26 a). Eine stattfindende Diffusion konnte durch UV- bzw. fluoreszenzspektroskopische Untersuchung festgestellt werden. Weitere Analyse mit Fluoreszenz-markierten Dextranen (FD) unterschiedlichen Molekulargewichts ergaben, dass 20 kDa FD scheinbar frei durch den Film diffundieren kann. Dextrane mit 40 kDa und 70 kDa ergaben einen Messwert von etwa 10 % des Wertes, der bei kompletter Durchmischung zu erwarten wäre (Abb. 3.26 b). Daher scheint die Ausschlussgröße der Filme zwischen 20 kDa und 40 kDa zu liegen. Dass Fluorescein-Maleimid einen geringeren Wert ergab, könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass dieses kleine Molekül durch hydrophobe Wechselwirkungen im Film gebunden bleibt, was weitere Diffusion verhindert.

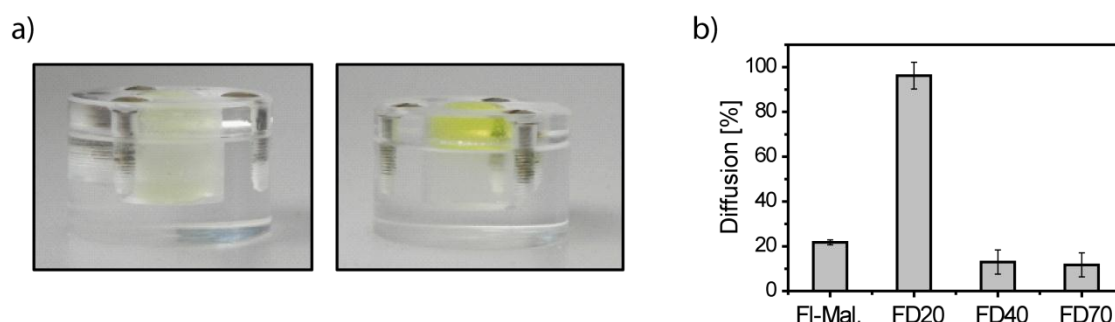


Abb. 3.26: Diffusion von Fluorescein-Maleimid (FI-Mal.) und Fluorescein-markierter Dextrane mit 20 kDa (FD20), 40 kDa (FD40) und 70 kDa (FD70) Molekulargewicht durch eADF4(C16) Filme. Die Filme (1 mg/cm^2) wurden aus HFIP gegossen und mit Methanol abs. nachbehandelt. (a) Diffusion von FD20 (links) bzw. von FD40 (rechts) nach 2 h Inkubation. (b) Gemessene Konzentration an FD in der unteren Kammer, angegeben in % des Wertes, der bei optimaler Durchmischung erhalten würde.

Funktionalisierung mit verschiedenen Effektormolekülen: RGD-Peptid, Nanogold, Biotin und β -Galactosidase

Mit Fluorescein konnten alle drei Cys-Proteine erfolgreich modifiziert werden. Aufgrund der höheren Ausbeute bei der Reinigung wurde für die folgenden Versuche nur $\text{ntag}^{\text{Cys}}\text{C16}$ verwendet. Zudem zeigte es höhere Stabilität gegenüber Aggregation als C16C* und C*C16. Standardmäßig wurden für alle folgenden Modifikationen Methanol abs.-behandelte Filme aus HFIP eingesetzt.

a) RGD-Peptid

Das bereits in Lösung gekoppelte c(RGDfK)-Maleimid (Abb. 3.23 a) wurde alternativ auch an bereits assemblierte $\text{ntag}^{\text{Cys}}\text{C16}$ Filme gebunden (Abb. 3.27 a). Die Kopplung und Analyse erfolgte wie für Fluorescein-Maleimid beschrieben. Mit $15,3 \text{ pmol}$ gebundenem Peptid pro cm^2 Film ergab sich ein sehr ähnlicher Wert wie bei Fluorescein. Aufgrund der geringen Größe des Moleküls scheint eine teilweise Diffusion in den Film auch hier plausibel. Die über beide Strategien hergestellten Filme – einmal Kopplung vor und einmal nach Filmbildung – wurden im Weiteren in Zellkultur-Experimenten eingesetzt (Kapitel 3.3).

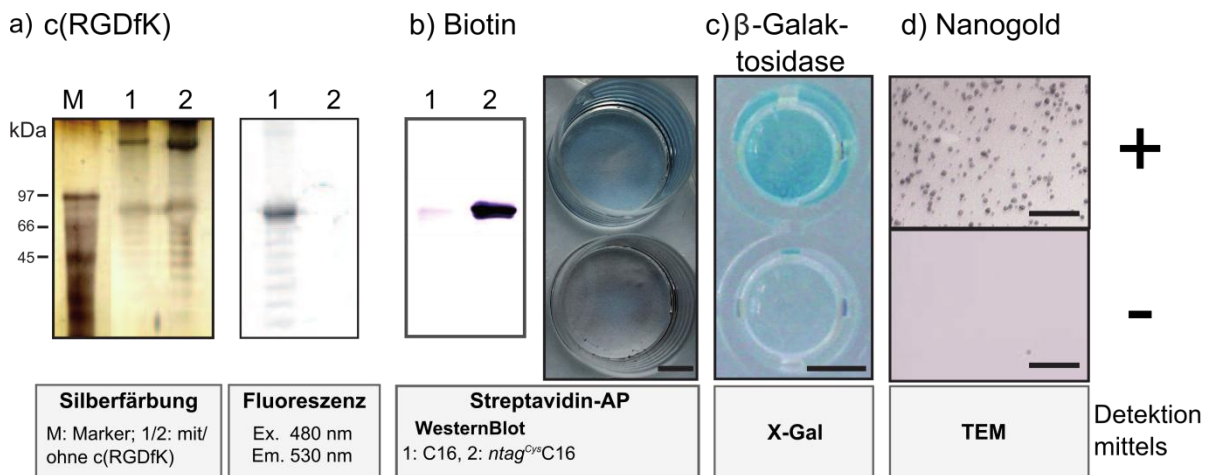


Abb. 3.27: Funktionalisierung rekombinanter Spinnenseidenfilme aus *ntag^{Cys}C16*. (a) Kopplung von c(RGDfK)-Maleimid, detektiert über Fluoreszenz der mittels SDS-PAGE analysierten, gelösten Filme. (b) Gebundenes Biotin, detektiert mittels BCIP/NBT nach Inkubation mit Streptavidin-AP (blau-violettes Signal). Der Nachweis erfolgte direkt auf dem Film (rechts) sowie nach Auflösen des Films und anschließendem Western-Blot (links). (c) Die Aktivität immobilisierter β -Galaktosidase wurde durch Reaktion mit X-Gal visualisiert, wobei ein blauer Niederschlag entsteht. (d) TEM-Analyse von mit Nanogold gekoppelten Filmen nach Verstärkung (*gold-enhance*) für 2 min. Als Kontrolle (-) ist ein eADF4(C16)-Film gezeigt, welcher derselben Kopplungsbehandlung unterzogen wurde (b und c) bzw. ein *ntag^{Cys}C16*-Film ohne Zusatz von Nanogold, jedoch mit Inkubation in Verstärkerlösung (d). Messbalken: b und c: 0,5 cm, d: 50 nm.

(nach Spiess *et al.*, 2010b, mit freundlicher Genehmigung des Verlags Royal Society of Chemistry)

b) Biotin

Biotin, ein kleines wasserlösliches Vitamin, ist bekannt für seine hohe Affinität zu Avidin und Streptavidin. Die dabei ausgebildete Bindung zählt zu den stärksten bekannten Interaktionen, welche rein auf nicht-kovalenten Interaktionen basieren. Das Molekül wurde als Maleimid-Konjugat kovalent an Spinnenseidenfilme gebunden. Der Nachweis der erfolgreichen Immobilisierung von Biotin erfolgte mit Streptavidin, welches zur Detektion an Alkalische Phosphatase gekoppelt war (Abb. 3.27 b). Sowohl bei Durchführung der Nachweisreaktion direkt auf dem Film als auch nach SDS-PAGE und Westernblot des aufgelösten Films zeigte sich eine spezifische Reaktion bei *ntag^{Cys}C16*. eADF4(C16) als Negativkontrolle hingegen lieferte kein Signal.

c) β -Galaktosidase

Zusätzlich wurde ein Makromolekül auf den Filmen immobilisiert, was beispielsweise für die Entwicklung von Biosensoren einen wichtigen Schritt darstellt. Dafür wurde das Enzym β -Galaktosidase gewählt (MW des aktiven Tetramers: ~465 kDa), welches glykosidische Bindungen spaltet. Die kovalente Anbindung an den Film wurde über einen heterobifunktionalen Linker in einer sequentiellen Kopplung erreicht (s. Kapitel 2.1.1.2 und 2.4.6.2). Dieser besaß einen NHS-Ester zur Reaktion mit primären Aminen des Enzyms sowie einen Maleimid-Gruppe zur Immobilisierung des Linker-Enzym-Komplexes auf dem Thiol-

haltigen Film. Nach einigen Waschschritten zur Entfernung von nicht-gebundenem Enzym wurde dessen Anwesenheit sowie Aktivität durch Zugabe von X-Gal überprüft. Dieses wird durch aktives Enzym gespalten, wobei ein unlösliches blaues Produkt entsteht. eADF4(C16) Filme dienten als Kontrolle, ob die Waschschrritte effektiv genug waren um unspezifische, nicht-kovalente Interaktionen zu verhindern. Abb. 3.27 c zeigt den positiven Nachweis von aktivem Enzym.

d) Nanogold

Eine Funktionalisierung mit Gold-Nanopartikeln bietet die Möglichkeit, durch anschließende Analyse im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) Einblicke in die räumliche Anordnung der gekoppelten Moleküle zu erhalten. In der Anwendung ist Gold besonders hinsichtlich seiner spezifischen Chemie und katalytischen Aktivität sowie wegen der dadurch ermöglichten Leitfähigkeit von Interesse. Die Kopplung erfolgte in Form von Mono-maleimido-Nanogold (mit einem Durchmesser von 1,4 nm) wie in Kapitel 2.4.6.2 beschrieben. Zur besseren Detektierbarkeit wurden die Goldpartikel anschließend einem Verstärkungsschritt unterzogen, bei dem spezifisch weiteres Gold angelagert wird. Über die Inkubationsdauer der Verstärkung wird die Größe der erhaltenen Goldpartikel beeinflusst. Nach zweiminütiger Inkubation waren Partikel von 2-5 nm Durchmesser im TEM zu erkennen (Abb. 3.27 d). Die Signale waren dabei mit 185 fmol/cm^2 über die gesamte Filmoberfläche verteilt, ohne dass ein Muster zu erkennen war. Aus den erhaltenen Aufnahmen scheint eine zufällige Anordnung der Moleküle an der Filmoberfläche wahrscheinlich.

3.3 Untersuchung potentieller Anwendungen von (modifizierten)

eADF4(C16)-Filmen

Filme aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) bzw. seiner Cys-Varianten wurden im Hinblick auf zwei Anwendungsfelder analysiert. Eines zielt Richtung biomedizinischer Bereiche, wozu zunächst die grundsätzliche Verträglichkeit/Biokompatibilität der Filme getestet wurde (Kapitel 3.3.1). Als zweites standen Oberflächeneigenschaften der Filme bei Beschichtung technischer Materialien im Fokus (Kapitel 3.3.2).

3.3.1 Analyse der Biokompatibilität in Zellkultur-Untersuchungen

Eine Anwendung von auf Spinnenseide basierenden Materialien ist besonders im medizinischen Bereich von großem Interesse. Während für natürliche Spinnenseide eine gute Verträglichkeit bekannt ist (Rising *et al.*, 2010; Altman *et al.*, 2003; Allmeling *et al.*, 2006), lagen keine Daten zur Interaktion des rekombinant hergestellten Proteins eADF4(C16) mit

biologischem Material vor. Erste Anhaltspunkte dafür lieferten in dieser Arbeit *in vitro* Zellkultur-Experimente.

3.3.1.1 Generelle Parameter der Filmpräparation und Zellkultivierung

Im Folgenden wurde daher die Kultivierung von Zellen auf Filmen rekombinanter Spinnen-seidenproteine untersucht. Als Zelllinie wurde MC3T3-E1 verwendet (ACC 210, DSZM). Dabei handelt es sich um murine embryonale Zellen der Schädeldecke. Sie sind fibroblastenartig, können sich jedoch bei entsprechender Stimulierung auch zu Osteoblasten differenzieren. Diese Zelllinie findet breite Verwendung in der Untersuchung von Zelladhäsion und -proliferation. Außerdem weist sie ein auf c(RGDfK) responsives Integrin-Expressionsmuster auf (Kantlehner *et al.*, 2000).

Die Zellkulturexperimente wurden zum einen auf eADF4(C16) Filmen durchgeführt, welche aus verschiedenen Lösungsmitteln gegossen waren. Als weiterer Punkt wurde der Einfluss verschiedener Nachbehandlungsmethoden untersucht. Zum anderen kamen mit RGD-Peptid modifizierte Filme zum Einsatz.

Alle Filme wurden direkt aus der jeweiligen Proteinlösung (3 mg/ml) in Zellkulturplatten aus (unbehandeltem) Polystyrol gegossen. Die Proteinmenge betrug dabei $0,15 \text{ mg/cm}^2$, was in Filmen von etwa $0,5\text{-}1 \text{ }\mu\text{m}$ Dicke resultiert. Nach Nachbehandlung und Trocknung der Filme wurden sie jeweils zweimal mit PBS und dem verwendeten Zellkultur-Medium gewaschen, bevor die Zellen darauf ausgesät wurden. Als Kontrolle dienten jeweils Polystyrol-Platten ohne Film („unbeschichtet“) bzw. speziell für gute Zelladhäsion entwickelte, modifizierte Polystyrol-Platten („Positivkontrolle“). Soweit nicht anders vermerkt, wurde immer Zellkulturmedium mit Zusatz von 10 % Kälberserum (FKS) verwendet.

3.3.1.2 Einfluss des Lösungsmittels

Zur Untersuchung, ob die Wahl des Lösungsmittels die Interaktion der daraus gegossenen Filme mit den Zellen beeinflusst, kamen mit Methanol abs. nachbehandelte eADF4(C16) Filme aus HFIP, Ameisensäure und wässriger Pufferlösung (wL) zum Einsatz. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von sieben Tagen auf den Filmen kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten hinsichtlich ihrer Vitalität untersucht. Diese wurde mittels WST-Assay bestimmt (s. Kapitel 2.8.2), welcher die mitochondriale Enzymaktivität misst. Unter der Annahme, dass alle vitalen Zellen eine vergleichbare Enzymaktivität aufweisen, kann daraus auch indirekt auf die relative Zellzahl bzw. Zellvermehrung geschlossen werden. Die gemessenen Werte wurden jeweils auf die Positivkontrolle normiert.

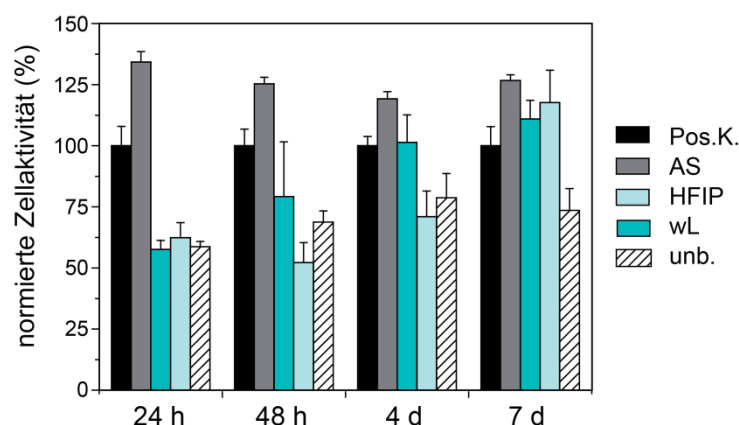


Abb. 3.28: Zellaktivität von MC3T3-Zellen auf eADF4(C16) Filmen in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer. Die Filme wurden aus dem jeweils angegebenen Lösungsmittel gegossen und mit Methanol abs. behandelt. Nach 24 h, 48 h, 4 d sowie 7 d Kultivierung der Zellen auf den Filmen wurde ihre Viabilität mittels WST-Assay bestimmt und auf den erhaltenen Wert der Positivkontrolle (Kultivierung in optimierten Zellkulturplatten) normiert. Die Werte wurden jeweils aus Vierfachbestimmung erhalten ($n=4$). Für die Analyse nach 24 h, 48 h sowie 4 d wurden jeweils 5×10^3 Zellen pro well ausgesät, für den 7 d-Versuch $2,5 \times 10^3$ Zellen pro well.

Auf Ameisensäure-Filmen liegt die Zellvitalität bereits nach 24 h etwas höher als bei der Positivkontrolle, während auf HFIP- und wL-Filmen zunächst eine niedrigere Vitalität vergleichbar der auf unbeschichteten Platten ohne Film beobachtet wird (Abb. 3.28). Mit zunehmender Kultivierungsdauer steigt der Wert und beträgt nach 4 d 70 % (HFIP) bzw. 100 % (wL) im Vergleich zur Positivkontrolle. Nach 7 d weisen die Zellen auf allen Filmen Werte über 100 % auf. Somit wirkt eADF4(C16) in Form der hier untersuchten Filme nicht cytotoxisch, sondern ermöglicht eine Kultivierung und Vermehrung der Zellen. Auf Filmen aus HFIP und wL scheint die Proliferation etwas verzögert, auf Ameisensäure-Filmen hingegen vergleichbar der Positivkontrolle.

Als weiteres wichtiges Kriterium wurde die Morphologie der Zellen auf den Spinnen-seidenfilmen betrachtet. Lichtmikroskopische Aufnahmen (in Abb. 3.29 gezeigt nach 48 h Kultivierung auf Seidenfilmen) zeigen eine typisch flache, ausgebreitete Zellmorphologie auf allen Filmen, wobei keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollplatten zu erkennen sind.

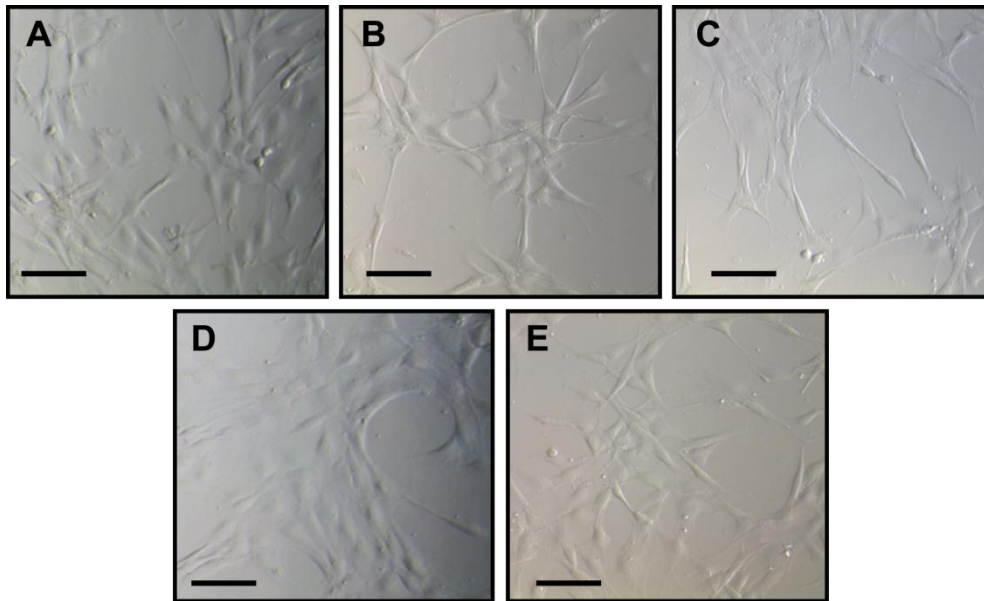


Abb. 3.29: Lichtmikroskopische Aufnahmen von MC3T3-Zellen nach 48-stündiger Kultivierung auf mit Methanol abs. nachbehandelten eADF4(C16) Filmen gegossen aus Ameisensäure (A), HFIP (B) oder wL (C). Als Vergleich dienten Zellen kultiviert in entsprechenden Platten ohne Film (unbeschichtet, E) sowie in speziell behandelten Zellkulturplatten (Positivkontrolle, D). Messbalken: 100 μm .

Nach einer gewissen Inkubationszeit (meist ca. 4 d) lösten sich die Zellen auf allen Seidenfilmen im Gegensatz zu Zellkulturplatten ohne Film jedoch verstärkt als Zellverbund ab. Durch Aussäen einer geringeren Anfangszellzahl konnten die Zellen jedoch 7 d und länger auf den Filmen inkubiert werden, so dass der Grund für das Ablösen nicht die zeitliche Exposition, sondern die Konfluenz der Zellen zu sein scheint. Ab Erreichen einer gewissen Zelldichte sind anscheinend die Kräfte zwischen den Zellen stärker als die Adhäsion auf dem Proteinfilm. Um eine stärkere Adhäsion auf den Filmen zu erreichen, wurden diese mit dem bereits beschriebenen RGD-Peptid modifiziert (s. Kapitel 3.3.1.4).

Um zu überprüfen, ob möglicherweise restliches organisches Lösungsmittel über die Zeit aus den Filmen abgegeben wird und das Zellverhalten bestimmt, wurden Filme in einem parallelen Ansatz 4 d mit Medium allein inkubiert (bei 37 °C) und die Zellen nach Medienwechsel ausgesät. Diese Behandlung führte jedoch zu keiner Veränderung des beobachteten Zellverhaltens.

3.3.1.3 Einfluss der Nachbehandlung

Wie in Kapitel 3.1.1.2 gezeigt, führen die in dieser Arbeit getesteten Nachbehandlungsarten alle zu einer vermehrten Ausbildung von β -Faltblatt-Struktur, so dass sich die jeweiligen Filme kaum in ihrer Sekundärstruktur unterscheiden. Allerdings wurden in Abhängigkeit der Nachbehandlung Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit der Filme festgestellt (s. 3.1.4). Daher wurde im Folgenden überprüft, ob sich dies auf die Interaktion mit Zellen auswirkt. Untersucht wurden Filme, die jeweils über Nacht mit Alkohol (70 % und abs.) bzw.

mit 1 M Kaliumphosphat inkubiert worden waren. Aufgrund der Toxizität von Methanol sowie der weitverbreiteten Anwendung von Ethanol in Zellkulturarbeiten wurde neben Methanol auch Ethanol verwendet.

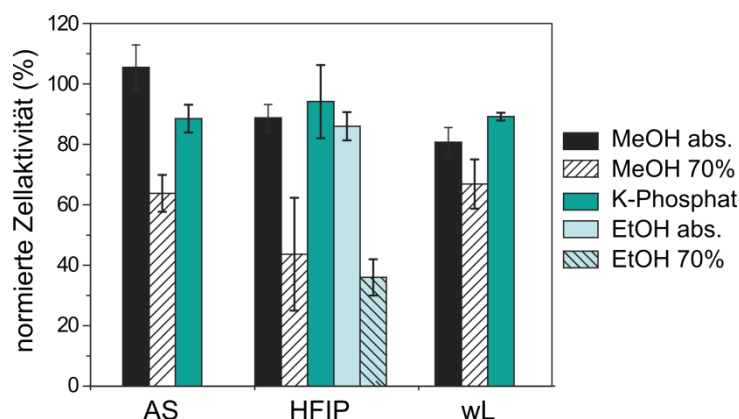


Abb. 3.30: Zellaktivität von MC3T3-Zellen auf eADF4(C16) Filmen in Abhängigkeit der Nachbehandlungsmethode. Die Filme wurden aus dem jeweils angegebenen Lösungsmittel gegossen und ÜN mit Methanol (70 % und abs.) bzw. 1 M Kaliumphosphat (pH 8) behandelt. HFIP-Filme wurden zusätzlich mit Ethanol (EtOH, 70% und abs.) behandelt. Nach 48 h Inkubation wurde die Zellaktivität mittels WST-Assay bestimmt (n=4) und auf den erhaltenen Wert der Positivkontrolle (=100 %) normiert.

Abb. 3.30 zeigt, dass eine Nachbehandlung mit Alkohol abs. oder Kaliumphosphat zu ähnlichen Ergebnissen führt, welche zwischen Filmen aus den verschiedenen Lösungsmitteln leicht variieren. Zwischen Methanol und Ethanol ist dabei kein signifikanter Unterschied festzustellen. Dies gilt auch bei Nachbehandlung mit 70 %-igem Alkohol, wobei hier bei allen Filmen die schlechtesten Werte erhalten wurden. Verglichen mit der Positivkontrolle erreicht die Mitochondrienaktivität auf diesen Filmen nur zwischen 35 % (HFIP) und 65 % (wL).

Um zu überprüfen, ob diese niedrigen Werte bei Nachbehandlung mit 70 % Alkohol möglicherweise durch noch vorhandenen Alkohol verursacht werden, wurden die Filme zusätzlich zu den sonst angewendeten zwei Waschschritten für 4 d mit Medium inkubiert (37 °C) und die Zellen anschließend nach Medienwechsel ausgesät. Diese Behandlung führte jedoch zu keiner Veränderung des beobachteten Effekts.

Lichtmikroskopische Untersuchungen der jeweiligen Probe bestätigt diese Beobachtung. Während die Zellen auf Filmen nachbehandelt mit Ethanol abs. und Kaliumphosphatlösung gut ausgebreitet sind und denen auf der Positivkontrolle entsprechen (Abb. 3.31 D-F), sind auf den Proben mit 70 % Ethanol bzw. Methanol nur wenig ausgebreitete Zellen zu erkennen. Der Großteil der Zellen liegt hier in abgerundeter Form und als Zellagglomerate vor, was auf schlechte Adhäsionsmöglichkeiten für die Zellen hindeutet (Abb. 3.31 A-C).

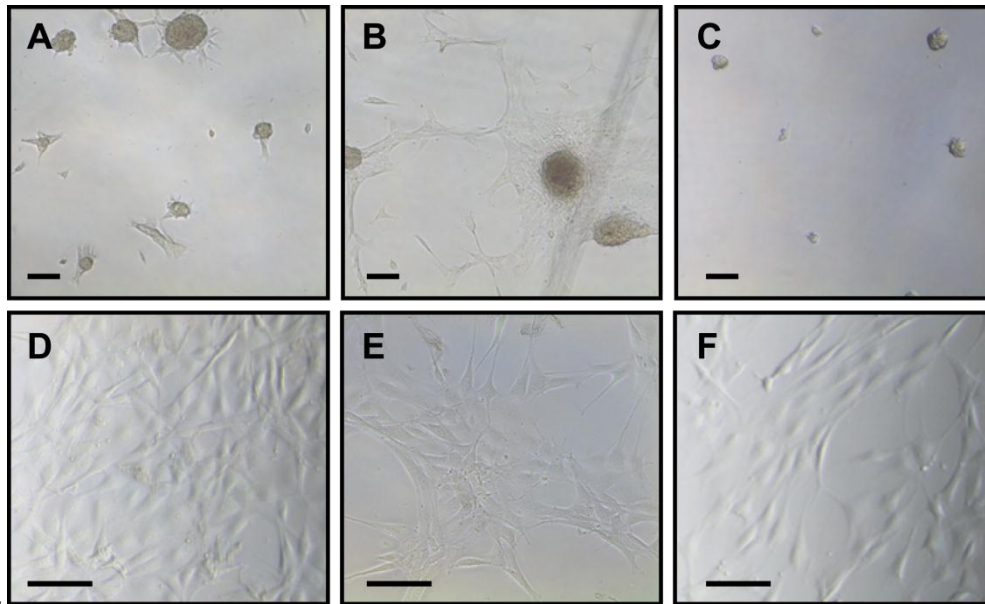


Abb. 3.31: Lichtmikroskopische Aufnahmen von MC3T3-Zellen nach 48-stündiger Kultivierung auf eADF4(C16) Filmen, welche unterschiedlich nachbehandelt wurden. (A-E): aus HFIP gegossene Filme, behandelt mit 70 % Ethanol (A), 70 % Methanol (B) und (C), Ethanol abs. (D) und 1 M Kaliumphosphat (pH 8) (E). (F): aus Ameisensäure gegossener Film, nachbehandelt mit 1 M Kaliumphosphat (pH 8). Messbalken: 100 μ m.

Zur genaueren Beurteilung der Zelladhäsion und -morphologie wurden Proben mit HFIP-Filmen zudem elektronenmikroskopisch untersucht. Aufgrund der schlechten Zellanheftung auf Filmen mit 70 % Alkohol-Behandlung konnten nach der Probenpräparation keine Zellen mehr analysiert werden. Auf Filmen inkubiert mit Methanol abs. und Kaliumphosphat hingegen weisen die MC3T3-Zellen ähnliche Charakteristika auf wie in der Kontrollprobe ohne Film. Abb. 3.32 zeigt eine typisch gespreitete Morphologie der Zellen (A) mit zahlreichen Zellfortsätzen und breiten, flachen Adhäsionsbereichen zwischen Zelle und Untergrund. Als einziger Unterschied zur Kontrollprobe sind auf den Seidenfilmen teilweise sehr lange Zellfortsätze zu erkennen (C).

Insgesamt ermöglichten eADF4(C16) Filme aus allen Lösungsmitteln die Kultivierung/ Proliferation der Zellen, wobei auf Filmen aus HFIP und wL eine Art *lag*-Phase beobachtet wurde. Die Wahl der Nachbehandlungsmethode beeinflusste die Adhäsion der Zellen. Auf mit 70 %-igem Alkohol (sowohl Methanol als auch Ethanol) behandelten Filmen traten deutlich schlechtere und inhomogene Ergebnisse auf, wohingegen Behandlung mit Kaliumphosphatlösung sowie Methanol/Ethanol abs. keinerlei negative Einflüsse zeigten.

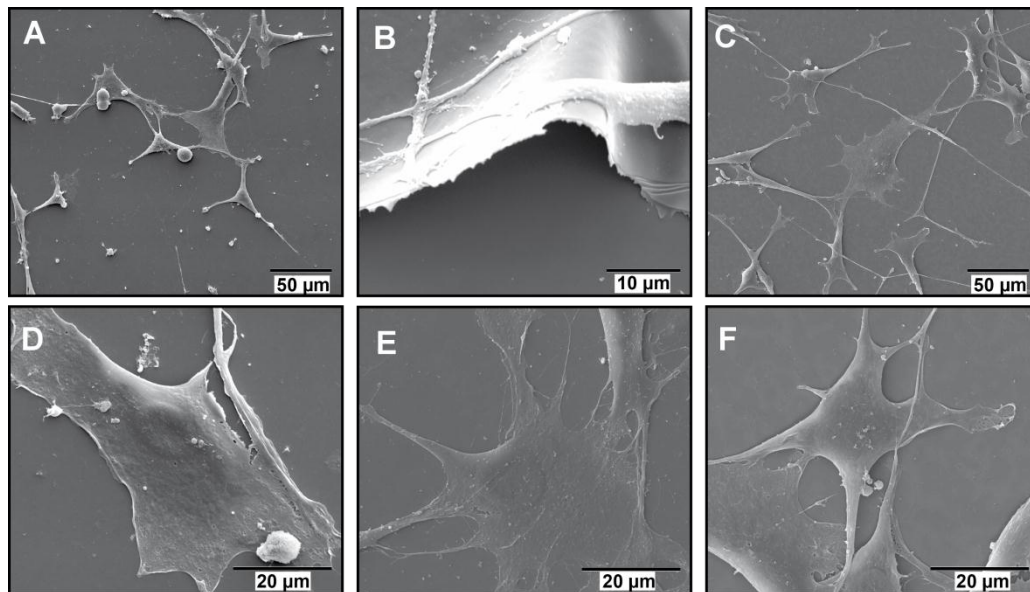


Abb. 3.32: REM-Aufnahmen von MC3T3-Zellen nach 48-stündiger Kultivierung auf eADF4(C16) Filmen. Gezeigt ist die Kontrollprobe ohne Film (A und D), sowie Proben mit HFIP-Filmen, welche mit Methanol abs. (B und E) bzw. 1 M Kaliumphosphat (pH 8) (C und F) nachbehandelt wurden. Die Analyse erfolgte im Hochvakuum nach Fixierung, Dehydratisierung und überkritischer Trocknung der Zellen.

3.3.1.4 Modifikation mit c(RGDfK)-Maleimid

Obwohl REM-Aufnahmen nach 48 h Kultivierung prinzipiell eine gute Adhäsion der Zellen sowie eine Morphologie vergleichbar der Kontrolle zeigten, lösten sich die Zellen nach längerer Inkubation verstärkt von den Filmen ab (s. 3.3.1.2). Dies deutet darauf hin, dass die Wechselwirkungen zwischen den Zellen größer sind als die Adhäsionskräfte zum Untergrund. Um eine verbesserte Adhäsion der Zellen an eADF4(C16) Filmen zu ermöglichen, wurden Filme der Cystein-Variante *ntag*^{Cys}C16 wie in Kapitel 3.2.2.2. und 3.2.3.2. beschrieben mit dem cyclischen RGD-Peptid c(RGDfK)-Maleimid modifiziert. Wie bereits beschrieben, stellt dieses Peptid ein Erkennungsmotiv für Integrin-vermittelte Zelladhäsion dar. Die Modifikation mit dem Peptid erfolgte entweder vor Assemblierung an Protein in Lösung (*ntag*-RGD (Lsg.)) oder an einen bereits assemblierten Film (*ntag*-RGD (Film)). Als Vergleich dienten nicht-modifizierte sowie in Lösung mit Fluorescein modifizierte *ntag*^{Cys}C16-Filme (*ntag*-FL). Alle Filme wurden mit Methanol abs. nachbehandelt.

Um gezielt die Stärke und Qualität der Adhäsion zu testen, wird häufig ein Adhäsionstest durchgeführt, bei dem die Menge der fest angehefteten Zellen nach 2-4 h Inkubation analysiert wird. Durch zweimaliges Waschen werden dabei nur schwach adhärierte Zellen entfernt, bevor wiederum mittels WST-Assay die verbleibenden Zellen erfasst werden. Da in dem üblicherweise dem Zellkulturmedium zugesetzten fötalen Kälberserum (FKS) neben Wachstumsfaktoren auch Bestandteile der ECM, und somit RGD-Motive, enthalten sein

können, wurde der Versuch ohne Zusatz von Serum durchgeführt, um den spezifischen Effekt einer RGD-vermittelten Interaktion zu untersuchen (Abb. 3.33 a).

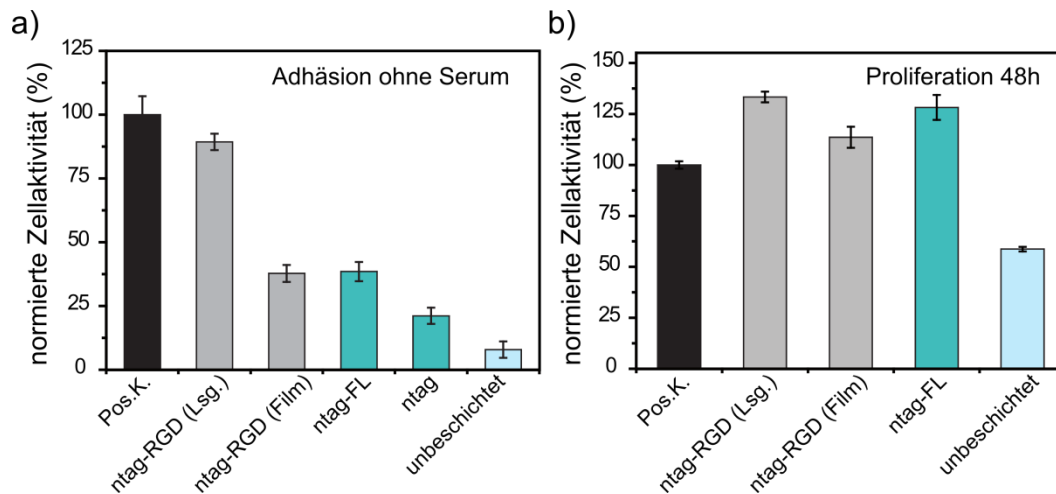


Abb. 3.33: Adhäsion und Proliferation von MC3T3-Zellen auf $ntag^{Cys}$ C16 Filmen modifiziert mit c(RGDfK)-Peptid. Aufgetragen ist die im Vergleich zur Positivkontrolle erhaltene Zellaktivität (bestimmt mittels WST-Assay, $n = 4$) in Prozent. Alle Filme wurden aus HFIP gegossen und mit Methanol abs. behandelt. Verglichen wurden Filme aus in Lösung mit RGD-Peptid (ntag-RGD (Lsg.)) bzw. Fluorescein (ntag-FL) modifiziertem Protein, nach Assemblierung modifizierte (ntag-RGD (Film)) sowie nicht-modifizierte (ntag) Filme. (A) Die Analyse der Adhäsion erfolgte nach 4 h Inkubation der Zellen in Medium ohne FKS. (B) Die Zellaktivität wurde nach 48 h Kultivierung in Medium mit FKS bestimmt.

Dabei zeigt sich ein klarer Einfluss des gekoppelten RGD-Peptids. Auf der unbeschichteten Zellkulturplatte und auf nicht-modifiziertem Film (ntag) können kaum Zellen adhären (9-20 % bezogen auf die Positivkontrolle). Auf nachträglich modifizierten $ntag^{Cys}$ C16 Filmen ist eine Verbesserung der Adhäsion auf etwa 37 % verglichen zur Positivkontrolle erkennbar. Allerdings fällt dabei auf, dass schon Fluorescein allein diesen Effekt verursachen kann. Eine klare Zunahme der Adhäsion auf etwa 90 % zeigen Filme aus in Lösung mit c(RGDfK) modifiziertem Protein.

Auch bei Untersuchung der Zellproliferation über 48 h zeigt sich ein Einfluss des RGD-Peptids, wenn auch weniger ausgeprägt (Abb. 3.33 b). Da für das Wachstum der Zellen über diesen Zeitraum im Serum enthaltene Faktoren von Bedeutung sind, wurde für diesen Versuch dem Medium FKS zugesetzt. Alle modifizierten Filme weisen mit 110-135 % höhere Werte als die Positivkontrolle auf. Wiederum zeigt in Lösung modifiziertes Protein den stärksten Effekt, wobei auch Fluorescein allein einen beträchtlichen Einfluss zu haben scheint. Im Vergleich dazu lagen die entsprechenden nicht-modifizierten eADF4(C16) Filme (aus HFIP, Nachbehandlung Methanol abs.) bei 60-80 % (Abb. 3.28, Abb. 3.30).

Lichtmikroskopische Untersuchungen bestätigten die beobachteten Effekte und sind in Abb. 3.34 für Zellen nach 24 h Inkubation in Medium ohne FKS gezeigt. Sowohl auf unbeschichteten Platten als auch auf nicht-modifizierten $ntag^{Cys}$ C16 Filmen weisen die Zellen

eine abgerundete Morphologie auf (Abb. 3.34 A und D). Bei mit Fluorescein gekoppelten Filmen zeigen sich teilweise ausgebreitete Zellen (B), während die Zellen auf mit c(RGDfK)-modifiziertem Film eine flache, gut ausgebreitete Morphologie besitzen (C).

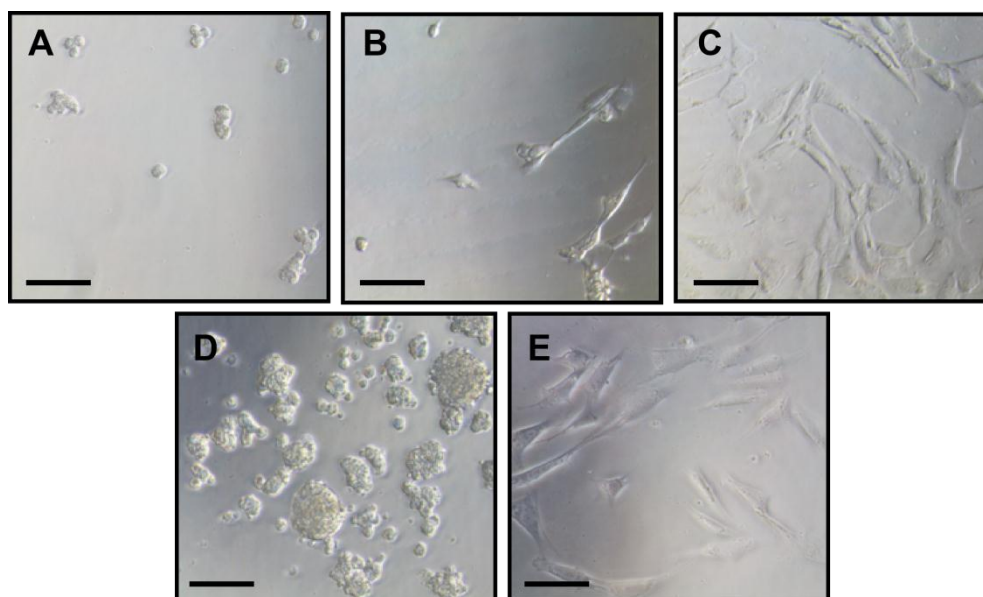


Abb. 3.34: Lichtmikroskopische Aufnahmen von MC3T3-Zellen nach 24-stündiger Kultivierung ohne FKS auf unterschiedlichen $ntag^{Cys}$ C16 Filmen. (A): nicht-modifizierter $ntag^{Cys}$ C16 Film; in Lösung mit Fluorescein (B) bzw. c(RGDfK) (C) modifizierter $ntag^{Cys}$ C16 Film; (D) unbeschichtete Zellkulturplatte; (E): Positivkontrolle (speziell behandelte Zellkulturplatte). Alle Filme wurden aus HFIP gegossen und mit Methanol abs. behandelt. Messbalken: 100 μ m.

3.3.2 eADF4(C16) Filme als Oberflächenbeschichtung – Einfluss des Substrats auf die Oberflächeneigenschaften

Oftmals werden Beschichtungen von Materialien dazu eingesetzt, um deren Oberflächeneigenschaften zu verändern. Hier wurden eADF4(C16) Filme in zwei verschiedenen Dicken (0,15 bzw. 0,5 mg Protein/cm²) auf Polystyrol, Teflon, sowie Glas aufgebracht und ihre Oberfläche hinsichtlich Rauheit sowie Benetzungsverhalten mit Wasser untersucht. Zudem wurde die Sekundärstruktur der Proteine in den resultierenden Filmen analysiert. Dabei wurden aus HFIP, Ameisensäure (AS) und wässriger Lösung (wL) gegossene Filme verglichen, die jeweils mit Methanol abs. nachbehandelt waren.

3.3.2.1 Hydrophobizität

Das Benetzungsverhalten von eADF4(C16) Filmen gegossen auf Polystyrol wurde in Abhängigkeit der Nachbehandlungsmethode bereits in Kapitel 3.1.4.2 beschrieben. Bei den Methanol-behandelten Filmen erwies sich der Film aus Ameisensäure etwas hydrophober als der aus wL gegossene Film, wohingegen HFIP zu den hydrophilsten Filmen führte. Dieser Trend bleibt auch bei verschiedenen Substraten und Filmdicken erhalten, mit der Ausnahme,

dass auf Glas wL-Filme die hydrophobste Oberfläche besitzen. Eine Beschichtung mit eADF4(C16) Filmen führt in allen Fällen zu einer Umkehr der Hydrophobizität des Substrats. Bei dickeren ($0,5 \text{ mg/cm}^2$) Filmen ist dieser Effekt stärker ausgeprägt als bei dünneren ($0,15 \text{ mg/cm}^2$) (Abb. 3.35). So verringert sich der Wasser-Kontaktwinkel auf den hydrophoben Oberflächen Polystyrol und Teflon von $\sim 90^\circ$ bzw. 105° auf etwa $39\text{--}63^\circ$ bei dickeren Filmen und auf etwa 65° bei dünnen Filmen. Bei Beschichtung von Glas hingegen erhöht sich der Kontaktwinkel von 28° auf $62\text{--}113^\circ$ (dicke Filme) bzw. $48\text{--}98^\circ$ (dünne Filme) (Abb. 3.35).

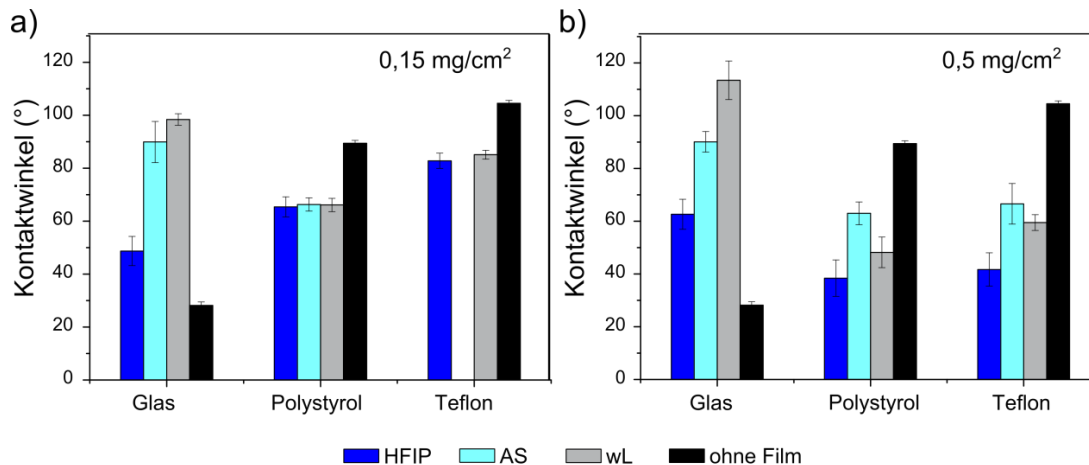


Abb. 3.35: Kontaktwinkel von Wasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$) auf eADF4(C16) Filmen gegossen aus HFIP, Ameisensäure (AS) oder Pufferlösung (wL) auf verschiedene Substrate (Polystyrol, Teflon, Glas). Alle Filme waren mit Methanol abs. nachbehandelt. (A) Filme aus $0,15 \text{ mg Protein/cm}^2$; der Film aus AS konnte auf Teflon nicht gemessen werden; (B) Filme aus $0,5 \text{ mg Protein/cm}^2$. (nach Wohlrab, Spiess, *et al.*, in Vorbereitung)

3.3.2.2 Topographie

Ein Vergleich der Oberflächentopographie mittels AFM ergab ähnliche Charakteristika wie bereits für Filme auf Polystyrol beschrieben (Kapitel 3.1.4.1). Aus an verschiedenen Bereichen des Films erstellten AFM-Aufnahmen wurde die Rauheit des jeweiligen Films bestimmt (Tabelle 3.9). Hierbei zeigt sich eine tendenziell glattere Oberfläche bei den auf Glas gegossenen Filmen als auf Polystyrol. Beschichtung von Teflon resultierte in Filmen mit höherer Rauheit verglichen zu Glas und Polystyrol. Es wurde nur eine Filmdicke analysiert, da in einer anderen Arbeit (Huppmann, 2010) kein Einfluss der Filmdicke auf ihre Rauheit festgestellt werden konnte. Wie in Kapitel 3.1.4 für auf Polystyrol gegossene Filme gezeigt, besaßen wL-Filme auf allen Substraten eine rauere und inhomogenere Oberfläche als solche gegossen aus HFIP und Ameisensäure.

Tabelle 3.9: Mittelrauheit von verschiedenen mit Methanol abs.-behandelten eADF4(C16) Filmen bei Beschichtung von Glas, Polystyrol und Teflon. Die Werte wurden aus mehreren stichprobenartig ausgeführten AFM-Aufnahmen über eine Fläche von $25\ \mu\text{m}^2$ erhalten und gemittelt. AS: Ameisensäure, wL: wässrige Lösung, n. b.: der Wert konnte nicht bestimmt werden. (nach Wohlrab, Spiess, *et al.*, in Vorbereitung)

Substrat	Mittlere Rauheit (nm)			
	HFIP	AS	wL	unbeschichtet
Glas	$1,3 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,4$	$8,3 \pm 0,9$	$1,0 \pm 0,2$
Polystyrol	$2,0 \pm 0,7$	$4,7 \pm 2,0$	$12,2 \pm 2,7$	$6,2 \pm 1,0$
Teflon (PTFE)	$10,0 \pm 2,5$	n. b.	$27,5 \pm 4,8$	$23,3 \pm 6,6$

3.3.2.3 Sekundärstruktur

Um eventuelle Unterschiede auf struktureller Ebene aufzudecken, wurden die Filme nach Trocknung vom jeweiligen Substrat abgezogen und FTIR-spektroskopisch untersucht. Die erhaltenen Spektren und die daraus mittels FSD bestimmten Sekundärstrukturanteile variieren in Abhängigkeit des Substrats (Abb. 3.36). Auffallend ist v. a. ein vom Lösungsmittel unabhängiger, höherer β -Faltblatt-Anteil bei Filmen gegossen auf Polystyrol und Teflon verglichen zu denen auf Glas. Damit einher geht ein niedrigerer Gehalt an *random coil* und α -helikalen Strukturen.

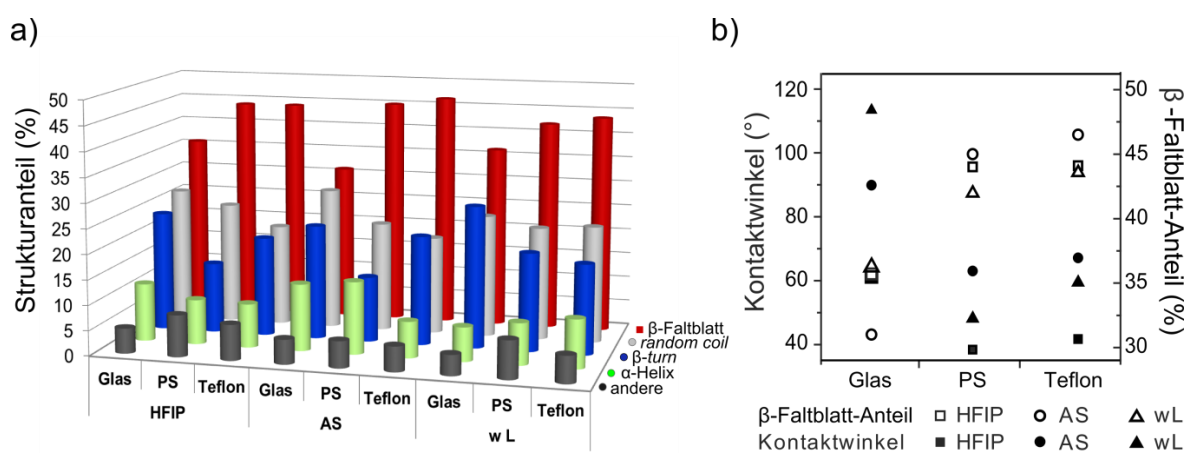


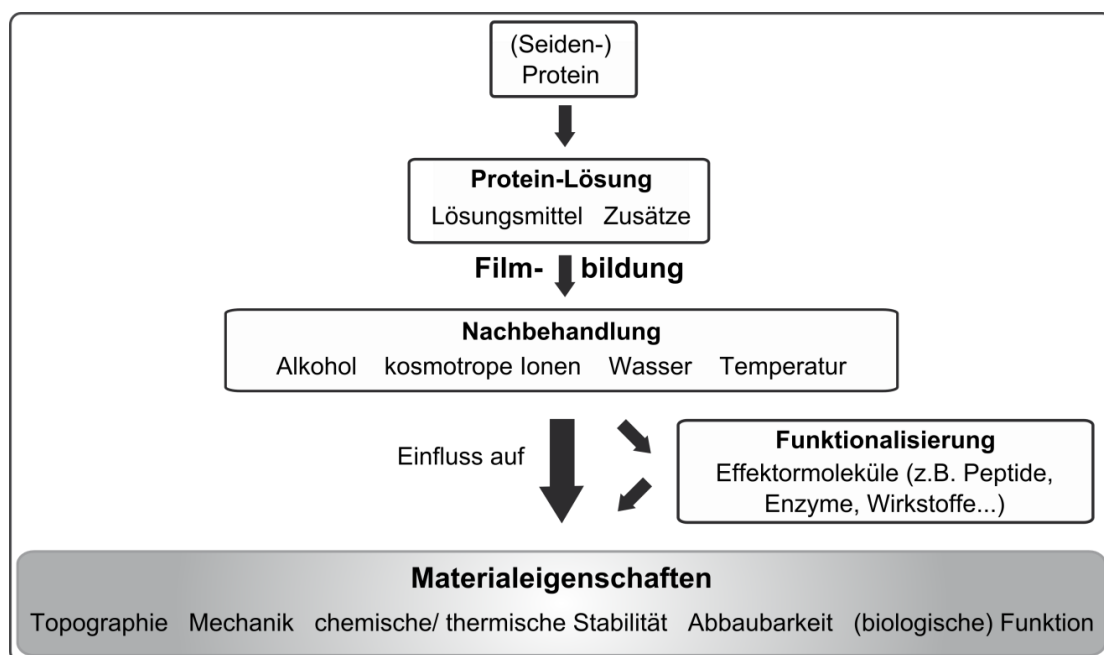
Abb. 3.36: (a) Sekundärstrukturanteile in eADF4(C16) Filmen bei Beschichtung verschiedener Substrate (PS: Polystyrol). Die Filme wurden aus dem jeweils angegebenen Lösungsmittel direkt auf das jeweilige Substrat gegossen, mit Methanol abs. behandelt und nach Abziehen im FTIR-Spektrometer analysiert. Die angegebenen Werte wurden mittels FSD bestimmt (s. Kapitel 2.5.4.1). (b) Vergleich der Kontaktwinkel von $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$ auf verschiedenen eADF4(C16) Filmen mit deren β -Faltblatt-Anteil (nach Wohlrab, Spiess, *et al.*, in Vorbereitung).

4 Diskussion

Seidenproteine stellen aufgrund ihrer mechanischen Eigenschaften, Biokompatibilität und Abbaubarkeit ein potentiell vielversprechendes Ausgangsmaterial für verschiedenste Materialien und Anwendungsbereiche dar. Eine für Beschichtungen oder (biokompatible) Trägersysteme interessante Anwendungsform stellen Filme dar, welche z. B. aus rekombinant hergestellten Spinnenseidenproteinen gebildet werden können.

Die Eigenschaften von Seidenfilmen lassen sich auf zwei Aspekte zurückführen: ihre makroskopischen Eigenschaften, wie Oberflächenstrukturierung oder mechanische Stabilität, sowie ihre molekulare Struktur. Beides kann über geeignete Wahl des Proteins sowie der Parameter bei der Filmherstellung beeinflusst werden, was eine Feinabstimmung der Filmeigenschaften an die Anforderungen bestimmter Applikationen erlaubt (Schema 4.1).

Die in dieser Arbeit analysierten Filme aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) wurden im Hinblick auf die Parameter Lösungsmittel, Nachbehandlungsmethode, Temperatur und Luftfeuchtigkeit untersucht. Zudem wurden die Filme mittels post-translationaler chemischer Kopplung diverser Moleküle funktionalisiert.



Schema 4.1: Einfluss verschiedener Parameter auf Materialeigenschaften von eADF4(C16)-Filmen. Schematisch dargestellt sind die einzelnen Schritte der Filmherstellung. Die Filmeigenschaften können dabei durch die Wahl einzelner oder kombinierter Faktoren kontrolliert werden.

(nach Spiess *et al.*, 2010a, mit freundlicher Genehmigung des Verlags John Wiley & Sons)

4.1 Einfluss verschiedener Parameter auf die eADF4(C16) Sekundärstruktur in Filmen

4.1.1 Einfluss des Lösungsmittels

In wässriger Pufferlösung (wL) zeigt eADF4(C16) CD-Spektren typisch für unstrukturierte Proteine bzw. Polyprolin II-Helices, mit einem kleinen Anteil anderer Strukturen. Damit ähnelt es der Struktur nativer MaSps (*major ampullate Spidroine*) in der Spinndrüse. Diese wurde als eine Mischung dynamischer helikaler Strukturen bzw. ungeordneter und Polyprolin II-helikaler Bereiche (Lefevre *et al.*, 2007a; Hijirida *et al.*, 1996) beschrieben. Zusätzlich wurden α -Helices beobachtet, welche jedoch den nicht-repetitiven Termini zugeordnet wurden und somit in eADF4(C16) – welches nur den repetitiven Sequenzteil enthält – nicht vorhanden sind. In Filmen hingegen war ein deutlicher Anteil an β -Faltblatt-Struktur zu sehen. Allerdings wiesen die aus Puffer gegossenen Filme strukturelle Inhomogenität auf, was sich auch in ihrem mechanischen Verhalten und ihrer Topologie manifestierte. Möglicherweise tritt bedingt durch Luftströmungen in der verwendeten Klimakammer eine inhomogene Trocknung der Filme auf, was zur Ausbildung lokaler Unterschiede in der Proteinkonzentration führen würde. Assemblierungsstudien von eADF4(C16) zeigten, dass die Kinetik der Ausbildung von β -Faltblättern – neben anderen Faktoren – direkt von der Proteinkonzentration abhängt (Slotta *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu traten keine vergleichbaren Inhomogenitäten in Filmen aus den organischen Lösungsmitteln auf. Da Wasser im Vergleich zu HFIP und Ameisensäure den niedrigsten Dampfdruck besitzt, können hier die ausgeprägtesten Trocknungsartefakte auftreten. Zudem wurden mittels statischer Lichtstreuung auch nach Ultrazentrifugation der Probe geringe Mengen von eADF4(C16) Oligomeren in wässriger Lösung (nach Dialyse) detektiert (s. Abb. 3.20). Diese könnten als Aggregationskeime fungieren und so lokale Strukturunterschiede bedingen.

Auch ein unterschiedlicher Wasseranteil könnte zu den beobachteten Unterschieden im Amid I-Bereich der FTIR-Spektren führen, da Wasser ein breites IR-Absorptionssignal bei etwa 1650 cm^{-1} erzeugt. Allerdings wäre dies zusätzlich an einer veränderten Absorption zwischen 3000 cm^{-1} und 3600 cm^{-1} zu erkennen, da sich in diesem Wellenzahlenbereich Valenz-schwingungen des Wassers und die Amid A-Bande von Proteinen überlagern. Entsprechende Spektren wurden jedoch nicht erhalten, so dass die veränderte Absorption der Amid I-Bande auf veränderte Sekundärstruktur der Proteine und nicht auf unterschiedlichen Wassergehalt in den jeweiligen Filmbereichen zurückzuführen ist.

Lösungen von eADF4(C16) in HFIP weisen im Vergleich zu wässrigen Proteinlösungen einen deutlich erhöhten Anteil an α -Helices auf. Diese Helix-induzierende Wirkung ist für fluoridierte Alkohole allgemein bekannt, wobei HFIP den stärksten Effekt bewirkt (Gast *et al.*, 2001; Hirota *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass dies auf bevorzugter Bindung des HFIP an das Polypeptid beruht, obwohl ein zusätzlicher Beitrag durch Modifizierung der Hydrat-/Solvathülle des Proteins nicht ausgeschlossen werden kann (Gast *et al.*, 2001). Auch nach Abdampfen des Lösungsmittels weisen HFIP-Filme den höchsten Anteil α -helikaler Struktur aller untersuchten Filme auf. Zudem besitzen die Filme den geringsten Anteil an β -Faltblatt-Struktur und insbesondere keine für Seiden typische β -Polyalanin-Strukturen. Analyse mittels ^{13}C -NMR bestätigte, dass die Alaninreste in Filmen aus HFIP vorwiegend in helikalen Strukturen (α -Helices und/oder 3_1 -Helices) vorliegen (Spiess *et al.*, 2011; durchgeführt von Dr. C. Keenan, AG Prof. J. Senker, Lehrstuhl für Anorganische Chemie III, Universität Bayreuth). Auch Glycin und Prolin waren teilweise in 3_1 -Helices angeordnet, einer Struktur, welche auch im Seidenfaden vorliegt (Holland *et al.*, 2008a). Signale für β -Faltblatt-Konformation zeigte nur Glycin, wohingegen Prolin, Glutamin und Tyrosin *random coil* Konformationen zugeordnet wurden (Spiess *et al.*, 2011).

Die Sekundärstruktur von eADF4(C16) gelöst in Ameisensäure konnte nicht bestimmt werden. Im Film besaß das Protein aber mit etwa 30 % den höchsten β -Faltblatt-Anteil. Eine Induktion von β -Faltblatt-Struktur durch Ameisensäure wurde auch bei anderen Proteinen beobachtet (Vasconcelos *et al.*, 2008; Ha *et al.*, 2005; Um *et al.*, 2001). Die Wirkung resultiert vermutlich aus Interaktion der stark polaren Säure mit polaren Aminosäureresten der Proteine. Untersuchungen mittels Trübheitsmessung, DLS und FTIR-Spektroskopie ergaben, dass Ameisensäure regeneriertes Fibroin einerseits in Lösung stabilisieren kann, das Protein aber eine kompakte Form annimmt, so dass die bereits in räumlicher Nähe liegenden hydrophoben Bereiche bei Entfernen des Lösungsmittels zu einer vermehrten Ausbildung geordneter β -Faltblätter führt (Vasconcelos *et al.*, 2008; Um *et al.*, 2003).

4.1.2 Einfluss chemischer und physikalischer Nachbehandlungsmethoden

Eine Nachbehandlung von Seidenfilmen mit Alkoholen und Kaliumphosphat führt zu einer Zunahme an β -Faltblatt-Struktur der beteiligten Seidenproteine. Der Effekt beruht vermutlich auf der Beeinflussung der Hydrat-/Solvathülle der Proteine sowie der Stärkung hydrophober Interaktionen. Stark polare Alkohole, wie Methanol und Ethanol, beeinflussen die Dielektrizitätskonstanten des Lösungsmittels und führen zu Entzug der Hydrathülle des Proteins (Um *et al.*, 2003). Kalium- sowie Phosphat-Ionen werden den kosmotropen Ionen der Hofmeisterserie zugeordnet (Baldwin, 1996; Hofmeister, 1888; Zhang & Cremer, 2006).

Somit führen beide Nachbehandlungsmethoden zu einer Stärkung hydrophober Interaktionen und somit zur bevorzugten Ausbildung inter- und intramolekularer Wechselwirkungen der Polypeptide im Vergleich zu Interaktionen mit umgebenden Lösungsmittelmolekülen. Dieser Effekt spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Strukturbildung von Seidenproteinen während des natürlichen Spinnprozesses, wo die Konzentration an Kalium- und Phosphat-Ionen im zweiten Abschnitt des Spinntrakts erhöht wird. Es wurde vermutet, dass dabei besonders Polyprolin II-Strukturen – welche in der Spinndrüse nachgewiesen wurden – aufgrund ihrer Geometrie thermodynamisch begünstigt in β -Faltblatt-Strukturen überführt werden können (Lefevre *et al.*, 2007a). In den hier untersuchten Filmen gegossen aus HFIP ergab eine NMR-Analyse, dass sich nach Behandlung mit Methanol die Konformation von Alanin- und Serinresten von Helices hin zu β -Faltblatt ändert, wobei nur etwa 10 % aller Alaninreste in helikaler Struktur verbleiben. Eine ähnliche Strukturänderung, wenn auch in geringerem Ausmaß, war für Glycin zu beobachten (Spiess *et al.*, 2011; durchgeführt von Dr. C. Keenan, AG Prof. J. Senker, Lst. für Anorganische Chemie III, Universität Bayreuth).

Eine Induktion von β -Faltblatt-Struktur war auch bei Filmen aus den anderen Lösungsmitteln zu beobachten. Mittels FSD von FTIR-Spektren ergaben sich gleiche prozentuale Anteile an β -Faltblatt-Struktur in behandelten Filmen, unabhängig vom Lösungsmittel und der verwendeten Nachbehandlungsmethode, was darauf hindeutet, dass damit die thermodynamisch günstigste Konformation erreicht ist. Aufgrund der Ausgangsstruktur in unbehandelten Filmen war die Strukturänderung bei HFIP-Filmen am stärksten ausgeprägt.

Andere Arbeiten beschreiben eine Abhängigkeit der Menge an gebildeten β -Faltblättern von der Konzentration des Alkohols (Lammel, 2010; Kweon & Park, 1999). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Allerdings traten die größten Unterschiede v. a. bei Konzentrationen unterhalb 60 % auf, welche hier nicht untersucht wurden. Ein weiterer Faktor ist zudem die Inkubationsdauer. Alle in dieser Arbeit verwendeten Filme wurden über Nacht (ca. 16 h) nachbehandelt. Zeitaufgelöste Messungen ergaben, dass bei den hier verwendeten Filmen (mit einer Dicke $\leq 15 \mu\text{m}$) die größte Änderung in der Struktur innerhalb von 30-60 min auftrat, jedoch über einige Stunden weiterhin zunahm (Daten nicht gezeigt). Nach dieser Zeit war kein signifikanter Unterschied (bzgl. der Sekundärstruktur) zwischen mit 70 % bzw. 100 % Alkohol nachbehandelten Proben zu erkennen, was auf das Erreichen eines Gleichgewichts schließen lässt.

Eine Zunahme an β -Faltblatt-Struktur konnte zudem – mit Ausnahme von HFIP Filmen – bei erhöhter Luftfeuchtigkeit festgestellt werden. Vermutlich ermöglicht die dadurch verzögerte Evaporation des Lösungsmittels und stärkere Hydratisierung der Proteine die Ausbildung

möglichst stabiler inter- und intramolekularer Interaktionen. Da mit steigender Luftfeuchtigkeit ein erhöhter Wassergehalt in den Filmen festgestellt wurde, ist auch eine direkte Beteiligung des Wassers (über Ausbildungen temporärer H-Brücken) an molekularen Umlagerungsprozessen sehr wahrscheinlich. Bei Filmen aus HFIP nimmt der Wassergehalt mit steigender Luftfeuchtigkeit ebenfalls zu. Hier verhindert aber möglicherweise der starke Einfluss des Lösungsmittels eine Änderung der Sekundärstruktur. Zum einen besitzt dieses Lösungsmittel (mit einem Siedepunkt von 58,2 °C) den höchsten Dampfdruck (~159 hPa bei 20 °C) der verwendeten Lösungsmittel und führt somit zur schnellsten Trocknung. Zum anderen zeigten TGA-, DSC- und FTIR-Messungen, dass HFIP bei RT in den Filmen gebunden bleibt (etwa 16 Gewichtsprozent).

Auch Temperaturen oberhalb von etwa 180 °C führten zu einer Zunahme an β -Struktur, wobei bei HFIP-Filmen eine Korrelation mit dem Abdampfen des Lösungsmittels zu erkennen war. Eine vergleichbare Strukturänderung trat bei Ameisensäure- und wL-Filmen bei etwas höheren Temperaturen auf. Zwei Effekte scheinen hierbei zusammen zu spielen: Einerseits das Abdampfen des struktur-beeinflussenden Lösungsmittels und andererseits die Zuführung einer Energiemenge, welche molekulare Umlagerungen ermöglicht. Ein Vergleich mit DSC-Messungen an Methanol-behandelten Filmen zeigt, dass auch hier in einem ähnlichen Temperaturbereich (etwa 200 °C) Änderungen auftreten. Der Versatz in diesen Kurven kann in Anlehnung an Erfahrungen mit Polymeren als Glasübergang interpretiert werden (Ehrenstein *et al.*, 1998; Magoshi *et al.*, 1977; Magoshi & Nakamura, 1975). Im Fall von Proteinen wurde dies als Erhöhung der Beweglichkeit der Moleküle gedeutet, vermutlich durch Schwächung nicht-kovalenter Bindungen (Motta *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2008; Freddi *et al.*, 1999). Von entscheidender Bedeutung ist dabei der Hydratisierungsgrad der Proteine, wobei ein höherer Wassergehalt mit einer niedrigeren Glasübergangstemperatur T_g korreliert wird (Agarwal *et al.*, 1997; Motta *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2007). Auch dynamisch mechanische Analyse ergab Änderungen in dem mechanischen Verhalten der Filme in einem ähnlichen Temperaturbereich. Abhängig vom verwendeten Lösungsmittel und der Nachbehandlungsmethode verlieren sie ab 150-210 °C ihre Steifigkeit und zeigen plastische Verformung, was wiederum dem Auftreten eines Glasübergangs, und somit einer Erhöhung der molekularen Mobilität entspricht. Ohne mechanische Belastung führt dies zur vermehrten Ausbildung stabiler β -Faltblatt-Strukturen, wohingegen bei Anliegen externer Kräfte die mechanische Integrität zerstört wird.

4.2 Beeinflussung makroskopischer Eigenschaften

4.2.1 Chemische und thermische Beständigkeit

Neben einer Beeinflussung der Sekundärstruktur zeigen sich auch Effekte des verwendeten Lösungsmittels auf makroskopische Eigenschaften. So weisen die Filme je nach gewähltem Lösungsmittel unterschiedliche Beständigkeit gegenüber Wasser und Denaturierungsmitteln auf. Dies korreliert u. a. mit dem jeweiligen Gehalt an β -Faltblatt-Struktur. Während β -Faltblatt-reiche Filme (unbehandelte Ameisensäure-Filme sowie alle nachbehandelten Filme) eine chemische Stabilität vergleichbar der des natürlichen Seidenfadens aufweisen, nimmt mit abnehmendem β -Faltblatt-Anteil die Löslichkeit in schwächeren Denaturierungsmitteln (wie 8 M Harnstoff) zu. HFIP-Filme schließlich sind bereits in Wasser gut löslich.

Im Gegensatz dazu zeigt sich kein auffälliger Unterschied der thermischen Beständigkeit von Filmen aus unterschiedlichen Lösungsmitteln. Bei den bereits erwähnten Vorgängen des Verdampfens von Lösungsmittel bzw. der Strukturumwandlung hin zu β -Faltblatt variieren sie nur leicht in den jeweiligen Temperaturen. Thermische Zersetzung der Filme beginnt sowohl bei unbehandelten als auch Methanol-behandelten Filmen aller Lösungsmittel bei etwa 280 °C und zeigt ihr Hauptsignal bei 330 °C. Diese hohe Temperaturbeständigkeit kann vermutlich auf den hohen Anteil an β -Strukturen zurückgeführt werden, welche auch nach Erhitzen auf 280 °C mittels FTIR-Spektroskopie nachzuweisen waren. Aufgrund der Temperatur-induzierten Bildung von β -Faltblättern unterscheiden sich unbehandelte Filme nicht in ihrer Stabilität von (ebenfalls β -Faltblatt-reichen) Methanol-behandelten Filmen. Zudem können durch Prozesse wie Pyrolyse aromatischer Aminosäuren oder Aufbrechen von Peptidbindungen Peptide unabhängig von ihrer Konformation zersetzt werden.

4.2.2 Topographie

Sowohl die Wahl des Lösungsmittels als auch die Nachbehandlungsmethode führte zu einer unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheit der Filme. HFIP-Filme wiesen die glatteste Oberfläche auf, was vermutlich an der niedrigen Oberflächenspannung und damit einhergehend der guten Benetzbarkeit der Oberfläche sowie dem hohen Dampfdruck des HFIP liegt. Verzögerte Evaporation des Lösungsmittels könnte hingegen zu Aufplatzen der Filmoberfläche führen und somit die Ursache für die Löcher bzw. Dellen in Ameisensäure-Filmen darstellen. Filme aus wässriger Lösung fielen v. a. durch eine heterogene und rauere Oberflächentopographie auf. Dies steht vermutlich in Zusammenhang mit der bereits beschriebenen ungleichmäßigen Trocknung der Filme oder der Anwesenheit von Aggregationskeimen, welche auch zur Ausbildung lokaler Unterschiede der Sekundärstruktur-

Zusammensetzung führt. Ein ähnlicher Effekt auf die Topographie (heterogene und raue Oberfläche) wurde bei Nachbehandlung aller Filme mit Wasser, wasser-haltigen Alkoholen oder Phosphatpuffer beobachtet. Eine mögliche Ursache könnten Umlagerungen der Moleküle nach Hydratisierung in Zusammenspiel mit dynamischer Bildung/Aufbrechen von Wasserstoff-Brücken darstellen. Interessanterweise trat der Effekt nicht bzw. nur in sehr geringem Ausmaß auf, wenn Methanol-behandelte Filme mit Wasser inkubiert wurden. Die Methanol-induzierte, kompakte β -Faltblatt-Struktur scheint nicht mehr durch Wasser beeinflusst zu werden. Ähnliches gilt für den natürlichen Seidenfaden: Durch Benetzung mit Wasser kommt es zur Superkontraktion; hydratisiert und umgelagert werden allerdings nur die Bereiche mit weniger geordneter Struktur, wohingegen kristalline β -Faltblatt-Regionen unverändert bleiben (Holland *et al.*, 2008b; Holland *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005).

Eine Nachbehandlung mit reinem Methanol verändert die Topographie der Filme nur geringfügig und resultiert in den glattesten und homogensten Oberflächen der nachbehandelten Filme.

4.2.3 Mechanische Eigenschaften und Rückschlüsse auf molekulare Anordnung

Mechanisches Verhalten

Die Wahl des Lösungsmittels zeigte einen deutlichen Effekt auf die mechanischen Eigenschaften der jeweiligen Filme, sowohl in unbehandelter als auch Methanol-behandelter Form. Wiederum lässt sich ein Zusammenhang mit der in den Filmen vorliegenden Sekundärstruktur erkennen. Eine generelle Korrelation bestimmter mechanischer Parameter mit dem Gehalt an β -Faltblatt-Struktur wurde bereits für Filme aus Seidenfibroin beschrieben (Vasconcelos *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2007). Die Wirkung beruht vermutlich darauf, dass regelmäßig angeordnete β -Faltblatt-Bereiche als physikalische Quervernetzung fungieren und dem Molekülverbund so Festigkeit verleihen (Keten & Buehler, 2010). Dies manifestiert sich in einer Erhöhung der maximalen Zugspannung und der Steifigkeit (E-Modul), wohingegen die Dehnbarkeit abnimmt. Es wurde beschrieben, dass der linear-elastische Bereich am Beginn einer Spannungs-Dehnungs-Kurve durch das Zusammenspiel von β -Faltblättern und flexibleren Strukturen bestimmt wird (Termonia, 1994). Ein höherer Anteil an β -Strukturen führt zu steiferem Verhalten, da sie *per se* unflexibler sind und durch Ausbildung von „Knotenpunkten“ zusätzlich die Beweglichkeit der flexibleren Bereiche einschränken. Dieser generelle Zusammenhang trifft auch auf die hier untersuchten Filme zu: Methanol-Behandlung führte bei allen Filmen zu einer Zunahme der Zugspannung und des E-Moduls. Auch *per se* β -Faltblatt-reichere Filme zeigten hier höhere Werte als jene mit niedrigerem Gehalt. Dies war auch an Filmen aus Pufferlösung zu sehen, die entsprechend ihrer

strukturellen Inhomogenität unterschiedliche mechanische Kennwerte ergaben. Plastisches Verhalten, zu erkennen an einer Abflachung der Spannungs-Dehnungs-Kurve mit Dehnung bei reduziertem Kraftaufwand, trat nur bei Filmen mit niedrigem β -Faltblatt-Anteil (HFIP und wL Typ I) auf. Dies beruht vermutlich auf einer Streckung und/oder Entflechtung von Polypeptidketten, begleitet vom Aufbrechen einiger Wasserstoffbrücken in den flexibleren Regionen (Termonia, 1994; Keten & Buehler, 2010). Diese Vorgänge werden in den β -Faltblatt-reichen Filmen wohl durch dichtere Packung der Moleküle bzw. mehr Interaktionspunkte eingeschränkt. Zu mechanischem Versagen, d. h. dem Reißen der Filme, kommt es vermutlich durch Aufbrechen intermolekularer Wechselwirkungen. Besonders Wasserstoff-Brücken zwischen den einzelnen β -Faltblatt-Strängen, aber auch die Grenzfläche zwischen flexibleren Ketten und starren β -Faltblatt-Kristallen sind dafür entscheidende Faktoren (Keten & Buehler, 2010).

Die generelle Korrelation zwischen β -Faltblatt-Gehalt und mechanischen Parametern bestätigte sich jedoch nicht bei Methanol-behandelten Filmen. Vergleicht man deren Eigenschaften untereinander, zeigen sich Unterschiede trotz gleichen Anteils an β -Faltblättern. Beispielsweise sind Methanol-behandelte HFIP-Filme weniger zugfest und mit einer sehr geringen Dehnbarkeit die sprödesten der untersuchten Filme. Der Grund hierfür könnte in der Ausdehnung und Verknüpfung der β -Faltblatt-Strukturen liegen. MD-Simulationen zeigten, dass die mechanische Stabilität von β -Faltblättern zunächst mit zunehmender Anzahl an H-Brücken bzw. mit zunehmender Länge der Stränge und zunehmender Stapelgröße steigt (Keten & Buehler, 2008a; Keten *et al.*, 2010). Ab Überschreiten einer kritischen Größe (Höhe und Länge) bzw. Geometrie von β -Faltblatt Strukturen nimmt die Stabilität jedoch rapide ab (Keten & Buehler, 2008a; Keten *et al.*, 2010). Begründet wird dies damit, dass die Wirkung von Scherkräften ab einer gewissen Geometrie relevant wird und zum Aufbrechen der Struktur führt, wohingegen bei kleinerer Geometrie ein sog. *slip-stick*-Mechanismus postuliert wird. Dieser führt zum Lösen von H-Brücken und Gleiten eines β -Stranges parallel zu den anderen Strängen, was die Neuausbildung intermolekularer Interaktionen ermöglicht. Dieser wiederkehrende Zyklus von Lösen und Neuausbildung von Wasserstoff-Brücken führt schließlich zu einer höheren mechanischen Stabilität dieser β -Faltblatt-Strukturen.

Aufgrund der starken und abrupten Strukturänderung, die in HFIP-Filmen nach Entfernen des Lösungsmittels durch Methanol-Behandlung auftritt, bilden sich möglicherweise β -Faltblatt-Anordnungen, welche sich ungünstig auf die mechanische Belastbarkeit auswirken (Abb. 4.1). Zudem fällt auf, dass in großem Ausmaß Helices der Strukturänderung unterliegen und die resultierenden Filme den geringsten α -Helix-Anteil aufweisen. In Filmen mit initial

höherem Gehalt an β -Faltblättern sind die Veränderungen durch die Nachbehandlung weniger ausgeprägt und gleichmäßiger auf die Sekundärstrukturelemente verteilt. Zudem wurde für Filme aus regeneriertem *B. mori* Seidenfibroin, welche aus Ameisensäure gegossen wurden, postuliert, dass die bereits vorhandenen Strukturen einer Ausbildung von Kristallen mit großer Fernordnung (*long-range order*) entgegenwirken (Um *et al.*, 2003).

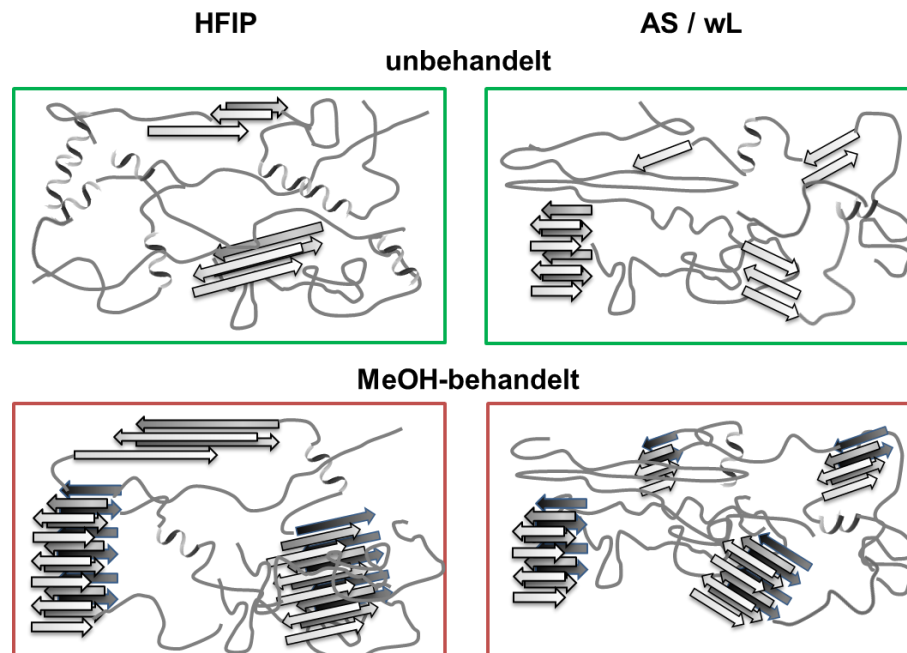


Abb. 4.1: Modell über verschiedene Anordnung von β -Faltblatt-Struktur in Methanol-behandelten Filmen gegossen aus HFIP oder Ameisensäure (AS) bzw. wässriger Pufferlösung (wL). Pfeile stellen β -Faltblatt-Bereiche dar, während graue Linien ungeordnete und flexible helikale Bereich repräsentieren.

Auf eine unterschiedliche Anordnung/Verknüpfung von β -Faltblatt-Strukturen deuten auch die Ergebnisse der dynamisch mechanischen Analyse hin. Der Abfall des Speichermoduls kann als Änderung der Molekülverknüpfung bzw. Zunahme der Kettenbeweglichkeit interpretiert werden. Bei unbehandelten Filmen ist eine Korrelation der Temperatur dieses Abfalls T' mit dem Gehalt an β -Faltblatt zu beobachten. Mit zunehmendem Gehalt steigt T' in der Reihenfolge HFIP < wL I < Ameisensäure (AS) < wL II. In Methanol-behandelten Filmen variiert T' ebenfalls, allerdings zeigen HFIP-Filme hier die höchste Temperatur (Reihenfolge: wL I < AS < wL II < HFIP). Somit wird hier mehr Energie benötigt, um eine entsprechende Mobilität der Moleküle zu erreichen, was ausgedehntere β -Faltblatt-Regionen erklären würden.

Orientierung

Eine unterschiedliche strukturelle Zusammensetzung bzw. Verknüpfung der Moleküle in den verschiedenen Filmen spiegelt sich auch in der Ausrichtung der in β -Faltblatt-Struktur vorliegenden Polyalanin-Blöcke (β -Polyalanine) als Reaktion auf externe Zugbelastung

wider. Mechanische Beanspruchung führt sicherlich zu komplexen und weitreichenden Vorgängen auf molekularer Ebene; im Rahmen dieser Arbeit wird jedoch nur auf β -Polyalanin-Strukturen eingegangen, welche ein distinktes FTIR-Signal erzeugen. Da dieses Signal in unbehandelten HFIP-Filmen nicht vorhanden ist, kann über diese Filme keine Aussage getroffen werden.

Vor Zugbelastung war keinerlei bevorzugte Ausrichtung der Polyalanine in den Filmen zu erkennen. Im Gegensatz zum Spinnen des Fadens, in welchem die Polyalanin-Cluster fast perfekt entlang der Fadenachse orientiert sind und der molekulare Ordnungsparameter S^{mol} bei 0,92 liegt, beinhaltet der verwendete Gießprozess der Filme keine externen Stimuli wie beispielsweise Elongationsfluss und Scherkräfte. Mit zunehmender Dehnung jedoch richten sich die β -Polyalanine in unbehandelten Filmen (Ameisensäure und wL) partiell entlang der Zugrichtung aus, wobei S^{mol} mit der Dehnung ansteigt. Diese Ausrichtung von einem isotropen Ausgangszustand vor Dehnung auf S^{mol} von etwa 0,2 nach 4-6 % Dehnung spiegelt somit die Mobilität der o. g. Struktur motive innerhalb des Filmnetzwerks wider. In Methanol-behandelten Filmen war keinerlei Zug-induzierte Ausrichtung zu erkennen, was in Übereinstimmung mit den mechanischen Kennwerten der Zugmessung auf eine starrere und unflexiblere Molekülverknüpfung durch den erhöhten β -Faltblatt-Anteil schließen lässt. Der Anstieg des Ordnungsparameters in unbehandelten Filmen trat erst ab einer gewissen Dehnung (von 1 bzw. 4,5 %, s. Kapitel 3.1.3.3) auf. Ab derselben Dehnung war auch eine Verschiebung der Vibrationsschwingung des β -Polyalanin-Signals zu beobachten. Diese Änderung wurde als Indiz für eine direkte Beeinflussung der Bindung durch die externe Kraft interpretiert (Papadopoulos *et al.*, 2009a; Papadopoulos *et al.*, 2007). Während bei Zugbelastung des Spinnfadens die Kraft sofort auf Polyalanin-Kristalle übertragen wird (Ene *et al.*, 2009; Papadopoulos *et al.*, 2009b; Papadopoulos *et al.*, 2007), werden diese in den Filmen erst nach Erreichen eines Schwellenwertes involviert. Somit führt die angelegte Zugkraft zunächst vermutlich zu einer Streckung/Dehnung flexibler Molekülbereiche, bevor β -Polyalanin-Strukturen involviert werden und sich infolgedessen teilweise ausrichten. Dieser Schwellenwert lag bei Ameisensäure-Filmen deutlich niedriger als bei wL-Filmen. Dem entsprechend sollten Ameisensäure-Filme weniger dehbare Elemente enthalten. Da das Amid I-Signal des wL-Films zu hohe Intensität/Streuung aufwies, kann keine Aussage über die genaue strukturelle Zusammensetzung dieses Filmes, und somit keine Zuordnung zu den unter Kapitel 3.1.1.1 beschriebenen Typen I oder II, getroffen werden.

Von den Methanol-behandelten Filmen zeigte nur der wL-Film eine Verschiebung des β -Polyalanin-Signals und somit einen Effekt der angelegten Kraft auf die beteiligten

Bindungen, jedoch ohne dass eine Ausrichtung der Struktur möglich war. Dass bei den Filmen aus Ameisensäure und HFIP keine Änderung des Signals auftrat, könnte zwei Ursachen haben. Zum einen könnten die β -Polyalanine umgangen werden, was aufgrund der beobachteten Steifigkeit/Zugspannung jedoch unwahrscheinlich erscheint. Zum anderen könnte ein sofortiges Aufbrechen einiger Wasserstoffbrücken erfolgen, entweder an der Kontaktfläche zwischen flexibleren und starren β -Faltblatt-Bereichen oder innerhalb der β -Faltblatt-Struktur. Für diese Erklärung spricht der abrupte Abfall der Kraft sofort nach jedem Dehnungsschritt, was auf eine sofortige Relaxation – möglicherweise durch Brechen von H-Brücken – hindeutet.

Eine induzierte Zunahme von β -Faltblatt-Struktur während der linearen Zugbelastung konnte anhand der FTIR-Spektren bei allen hier untersuchten eADF4(C16)-Filmen ausgeschlossen werden. Von einer solchen Induktion wurde bei Filmen aus regenerierten Seidenfibroin berichtet (Tsukada *et al.*, 1994; Yucel *et al.*, 2011). Allerdings handelt es sich hierbei um *B. mori* Seidenfibroin und die Streckung wurde zum Teil bei Temperaturen um T_g durchgeführt (Yucel *et al.*, 2011).

4.3 Modifizierung und Funktionalisierung von Spinnenseidenfilmen

Zusätzlich zu den inhärenten Eigenschaften des Films ist das Einbringen weiterer Funktionalitäten wünschenswert, um das potentielle Einsatzspektrum der Seidenfilme zu erweitern. Prinzipiell können solche Modifikationen bei Proteinen über Änderung der genetischen Information (*genetic engineering*) oder aber post-translational chemisch erfolgen. Die Modifikation auf genetischer Ebene ist dabei langwieriger, da jedes Konstrukt kloniert, rekombinant produziert und gereinigt werden muss. Andererseits bietet es aber den Vorteil einer 100 %-igen Veränderung des Proteins und einer reproduzierbaren Herstellung. Limitiert ist diese Methode allerdings dadurch, dass nur Modifikationen auf Aminosäurebasis möglich sind, welche zudem auf natürliche Bausteine begrenzt sind. Diese Strategie eignet sich beispielsweise gut für die Bildung chimärer Proteine mit funktionellen Peptidmotiven (Erkennungssequenzen, Bindedomänen, Adhäsionssignale, etc.), nicht jedoch z. B. für das Anbringen zyklischer Peptide. Eine post-translationale chemische Modifikation des Proteins hingegen erlaubt die Integration völlig unterschiedlicher Molekülklassen und -größen, solange entsprechende chemisch funktionelle Gruppen – in Form von Aminosäureseitenketten – vorhanden sind. Zudem können eine große Anzahl verschiedener Effektormoleküle in kurzer Zeit angefügt oder verschiedene Kombinationen getestet werden. Nachteile sind dabei meist

eine ineffizientere Kopplung sowie eventuell auftretende, unerwünschte Nebenreaktionen (z. B. mit konkurrierenden Bindestellen).

Für Seidenproteine wurden beide Ansätze bereits beschrieben. So wurden z. B. chimäre Proteine aus Spinnenseidenproteinen und einer Zelladhäsions-Erkennungssequenz bzw. einem Silica-präzipitierendem Peptid hergestellt (Bini *et al.*, 2006; Foo *et al.*, 2006) oder versucht, die Assemblierung der rekombinant hergestellten Seidenproteine durch Einbringen von sterisch anspruchsvollen Seitenketten zu beeinflussen (Szela *et al.*, 2000; Winkler *et al.*, 1999; Winkler *et al.*, 2000). An eADF4(C16) wurden über chemische Kopplung Fluorescein und ein Enzym angefügt (Huemmerich *et al.*, 2006). Die Reaktion erfolgte an Carboxygruppen von Glutamatresten nach EDC-Aktivierung. Damit wurde eine Kopplungseffizienz von etwa 70 % erreicht, aufgrund der 17 vorhandenen Carboxygruppen war die Verteilung jedoch heterogen und keine definierte Kopplung möglich. Mittels Amin-Chemie konnte die endständige Aminogruppe modifiziert werden (Wohlrab, 2010). Allerdings trat eine Mischung an ein- bis fünffach gekoppeltem Protein auf. Da eADF4(C16) keine weiteren primären Amine enthält, waren im gewählten pH-Bereich vermutlich auch Hydroxylgruppen von Tyrosinresten an der Reaktion beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Cystein-beinhaltende Derivate von eADF4(C16) hergestellt, um über die dadurch implementierte Thiolgruppe eine spezifische Kopplungsstelle zur kontrollierten Reaktion einzufügen. Da das ursprüngliche Protein keine Thiole enthält, konnte die Kopplung somit an der gewünschten, durch die Platzierung des Cysteins definierten Stelle erfolgen. Andererseits konnten mit diesem Ansatz nicht-natürliche Aminosäuresequenzen, wie eine zyklische Zelladhäsionssequenz, oder Metallpartikel angebracht werden.

Um eventuell auftretende Beeinträchtigungen der Assemblierungseigenschaften des Proteins oder Unterschiede in der Kopplungseffizienz zu identifizieren, wurden drei verschiedene Varianten hergestellt. Bei zwei war das Cystein im carboxyterminalen Bereich eines C-Moduls integriert, welches seinerseits als 17. Modul amino- bzw. carboxyterminal an eADF4(C16) angefügt wurde. Die dritte Variante enthielt das Cystein in einer aminoterminal angefügten kurzen Aminosäuresequenz (*ntag*^{Cys}C16). Untersuchungen der Sekundärstruktur und der Assemblierung dieser Cys-Proteine ergab keine signifikanten Änderungen zum Ursprungprotein. Alle Cys-Proteine bildeten Disulfid-verbrückte Dimere mit etwa 20-30 % Monomer-Anteil. Die Ausbildung und Stabilität von Disulfidbindungen sind stark abhängig von Umgebungsparametern, wie etwa dem Sauerstoffgehalt des Puffers. Jedoch erwies sich die Monomer-Dimer-Verteilung der drei Cys-Proteine in mehrfachen Ansätzen und bei

Analyse mit unterschiedlichen Methoden wie SDS-PAGE, nativ-PAGE (Spiess *et al.*, 2010b) und SEC als reproduzierbar. Ausgehend von der Annahme, dass zusätzlich zu der chemischen Umgebung der Cysteine strukturelle Faktoren wie räumliche Nähe und eine bestimmte Geometrie der Moleküle relativ zueinander die Ausbildung von Disulfidbrücken erleichtert sowie deren Stabilität erhöht, liegt der Grund für das etwas negativere Redoxpotential der Cysteine innerhalb des C-Moduls möglicherweise in dynamischen (nicht-kovalenten) Interaktionen der repetitiven C-Module. Dementsprechend sollte das Cystein in *ntag*^{Cys}C16 in einer vergleichsweise flexibleren Umgebung liegen, was zu einer besseren Zugänglichkeit des Thiols für Kopplungen führen würde.

Die Kopplungseffizienz für *ntag*^{Cys}C16 in Lösung lag zwischen 75 % und über 90 %. Möglicherweise spiegelt der etwas geringere Wert das dynamische Auftreten von Dimeren/Oligomeren über nicht-kovalente Wechselwirkungen wider, das in einer vorübergehenden schlechteren Zugänglichkeit einiger Thiolgruppen resultiert und somit eine vollständige Kopplung behindert. Das Anbringen kleiner Moleküle (Fluorescein, RGD-Peptid) behinderte dabei nicht die anschließende Assemblierung zu Filmen mit vergleichbaren strukturellen und morphologischen Charakteristika wie die von eADF4(C16) Filmen. Analyse dieser Filme mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie zeigte eine *patch*-förmige Anreicherung des Farbstoffs (Wohlrab, 2010). Dies könnte sowohl auf eine heterogene Anordnung der Moleküle im Film als auch auf Clusterbildung der hydrophoben Fluorescein-Moleküle im Film hindeuten. Eine selektive Quantifizierung von an der Filmoberfläche exponierten Effektormolekülen war nicht möglich. Jedoch wurde eine Steigerung der Zelladhäsion auf mit c(RGDfK)-funktionalisierten Filmen beobachtet, so dass hier das Peptid auch an der Filmoberfläche zugänglich sein muss.

Zum Anfügen größerer Moleküle und/oder um Kopplungsreagens einzusparen, sowie um gegebenenfalls eine gezielte Funktionalisierung der Filmoberfläche zu erreichen, wurden zudem bereits assemblierte Filme chemisch modifiziert. Bei den Kopplungsversuchen ergaben sich geringe Unterschiede zwischen den drei Cys-Varianten, mit dem stärksten Signal für *ntag*^{Cys}C16. Da es zudem in höherer Ausbeute hergestellt werden konnte und geringere Aggregationsanfälligkeit zeigte, wurde *ntag*^{Cys}C16 für weitere Kopplungsversuche eingesetzt. Über die verwendete Methode konnten sowohl Peptid-Sequenzen als auch Gold-Nanopartikel und das Enzym β -Galaktosidase unter Beibehaltung seiner Aktivität kovalent an die Filme gebunden werden.

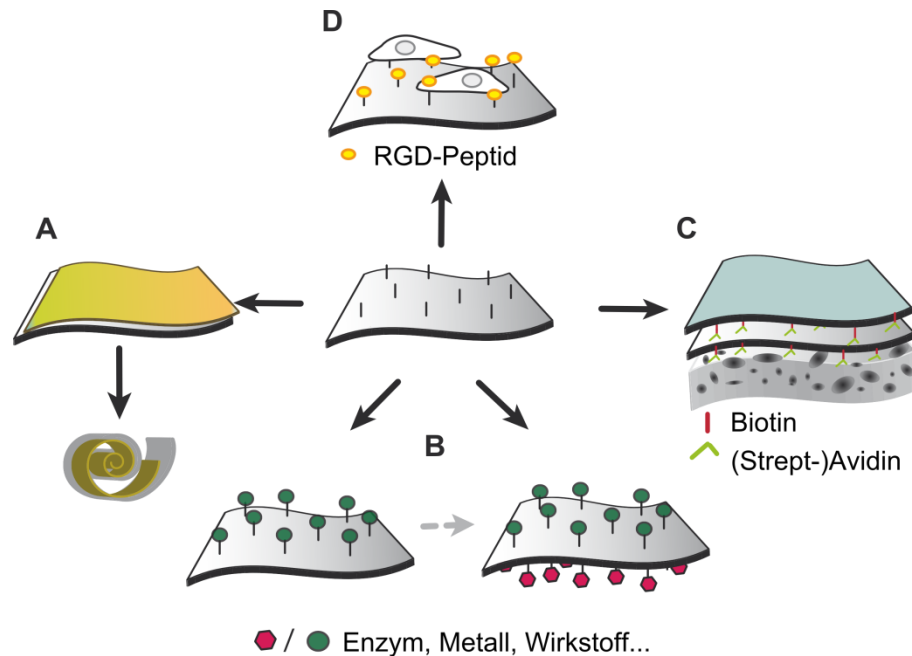
Für c(RGDfK) ergab sich genau wie für Fluorescein eine Kopplung von 15-16 pmol/cm² Film. Allerdings handelt es sich dabei vermutlich nicht um eine ausschließliche Modifi-

zierung der Oberfläche. Vielmehr zeigte sich, dass Fluorescein in den Film eindringen kann. Mittels initialer Diffusionsexperimente konnte eine Durchlässigkeit der Filme bis zu 20 kDa (bestimmt für Fluorescein-markiertes Dextran) gezeigt werden, was etwa einer Molekülgröße von 3,3 nm entspricht (Angabe des Herstellers). Ähnliche Werte wurden für die Permeabilität von Grenzflächen-assemblierten Kapseln aus eADF4(C16) erhalten (Hermanson *et al.*, 2007a). Eine Diffusion kleiner hydrophober oder positiv geladener Moleküle in eADF4(C16)-basierte Materialien wurde auch als Mechanismus der Beladung von Mikrokugeln mit Wirkstoffen beobachtet (Lammel *et al.*, 2011). Da es sich hierbei um einen reversiblen Prozess handelt, sind solche Systeme beispielsweise zur Speicherung und Freisetzung von Medikamenten (*drug delivery*) geeignet.

Der mit 0,185 pmol/cm² Film etwa hundertfach kleinere Wert der Kopplung von Goldpartikeln spricht hingegen für eine oberflächenspezifische Kopplung. Die mittels TEM analysierten Partikel waren ohne auffällige Musterbildung über den Film verteilt, was vermutlich auf dem bereits gezeigten Fehlen einer Vorzugsordnung der Seidenmonomere im Film beruht.

Die in dieser Arbeit gezeigte Modifikation rekombinanter Spinnenseidenfilme mit unterschiedlichen Molekülklassen liefert die Grundlage für weiterführende Funktionalisierungen (Schema 4.2). Die Möglichkeiten reichen dabei von der Herstellung leitender Materialien über Biosensoren hin zum Aufbau komplexer Materialien, beispielsweise für Geweberegeneration. So könnten durch Verstärkung der immobilisierten Goldpartikel (über spezifische Ablagerung von Metallen) Proteinfilme erhalten werden, welche mit einer durchgehend leitenden Oberfläche beschichtet sind (Schema 4.2 A). Neben Dünnschichttransistoren sind solche Systeme auch als Abschirmung von z. B. Prothesen interessant. Andererseits lassen sich durch Immobilisierung bestimmter Makromoleküle entsprechende Biosensoren herstellen. Die verwendete nachträgliche Kopplung bietet zusätzlich das Potential, in weiteren Schritten Filme an beiden Oberflächen selektiv zu modifizieren. Durch Verwenden einer zweiten chemischen Funktionalität, wie Amin-Chemie eines eingefügten Lysins, wären zudem kontrollierte Mehrfachkopplungen möglich (Schema 4.2 B). Modifizierung mit Biotin hingegen ermöglicht den Aufbau verschiedenster Schicht-Komposite, wobei die einzelnen Materialien ohne störende Einflüsse über die starke Biotin-(Strept-)Avidin-Interaktion verbunden werden (Schema 4.2 C). Angefügte Zelladhäsionssequenzen, wie RGD-Peptide, oder Wachstumsfaktoren können für gezielte Zell- und Gewebeinteraktion genutzt werden (Schema 4.2 D).

Möglicherweise verändert das eingefügte Cystein durch Ausbilden der kovalenten intermolekularen Bindung die mechanischen Eigenschaften der Filme. Dabei wäre durch die zusätzlichen Bindungen eine Erhöhung der Zugfestigkeit zu erwarten. Entsprechende Messungen wurden während dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt.



Schema 4.2: Funktionalisierungsmöglichkeiten von eADF4(C16)-basierten Spinnenseidenfilmen. (A) Herstellung von Filmen mit leitender Beschichtung, (B) selektive Modifizierung der Oberflächen mit variablen Effektormolekülen, (C) nicht-interferierende Verknüpfung verschiedener Materialien über Biotin und (Strept-)Avidin, (D) verbesserte/veränderte Zellinteraktion durch spezifische Moleküle (verändert nach Spiess *et al.*, 2010b mit freundlicher Genehmigung des Verlags Royal Society of Chemistry).

4.4 Einstellen definierter Oberflächeneigenschaften

Durch Beschichten verschiedener Substrate mit eADF4(C16)-Filmen wurden deren Oberflächeneigenschaften verändert. In dieser Arbeit wurde v. a. die Hydrophobizität der jeweiligen Oberfläche betrachtet, welche über Messung des Benetzungswinkels mit Wasser ermittelt wurde. Die Hydrophobizität der Oberfläche kehrte sich dabei bei allen untersuchten Substraten – Glas als hydrophile Oberfläche, sowie Polystyrol und Teflon als hydrophobe Materialien – nach Beschichtung mit dünnen Seidenfilmen um. Beschichtetes Glas zeigte den höchsten Benetzungswinkel, wohingegen die intrinsisch hydrophoben Materialien nun Benetzungswinkel $< 90^\circ$ aufwiesen.

Der Benetzungswinkel von Polymeren wird hauptsächlich von der Zusammensetzung und der Natur der chemischen Gruppen an der Oberfläche bestimmt (Tretinnikov & Tamada, 2001), jedoch kann auch die Topographie Einfluss auf den Benetzungswinkel nehmen (Krishnaji *et al.*, 2011; Wenzel, 1948). Letztere variierte zwischen Filmen aus verschiedenen Lösungsmitteln. Neben Faktoren wie der Oberflächenbenetzung des Substrats mit dem Protein-

Lösungsmittel-Gemisch könnte daher auch die Rauheit der Filmoberfläche eine Ursache für die beobachteten Unterschiede in der Benetzbarkeit darstellen, wobei Filme aus HFIP mit dem kleinsten Winkel am hydrophilsten und Ameisensäure-Filme am hydrophobsten waren.

Zwischen den unterschiedlichen mit Seidenfilmen beschichteten Substraten hingegen variierte die Rauheit nur in wesentlich geringerem Maße als die Benetzbarkeit, so dass die veränderten Oberflächeneigenschaften vermutlich auf weitere Faktoren zurückzuführen sind. Eine Änderung des Benetzungsverhaltens kann beispielsweise durch strukturelle Unterschiede und Umlagerungen begründet sein, wenn dadurch andere funktionelle Gruppen exponiert werden bzw. andere Wechselwirkungen, beispielsweise vermittelt über Wasserstoffbrücken, auftreten (Tretinnikov & Tamada, 2001). Auch die hier untersuchten eADF4(C16)-Filme unterscheiden sich in ihrer Sekundärstruktur-Zusammensetzung je nach verwendetem Substrat, wobei alle Filme nach Methanol-Behandlung analysiert wurden. Die auf Glas gegossenen Filme weisen einen niedrigeren Anteil an β -Faltblatt und einen höheren Anteil an α -Helices und *random coil*-Konformation auf als die auf Teflon bzw. Polystyrol.

Möglicherweise verhindern stabilisierende Wechselwirkungen zwischen hydrophilen Gruppen der Glasoberfläche und des Proteins eine effiziente (Methanol-induzierte) Umlagerung dieser Bereiche in β -Faltblatt-Strukturen, wohingegen hydrophobe Oberflächen deren Ausbildung fördern. Der dadurch höhere Anteil flexibler Strukturelemente könnte dazu führen, dass bevorzugt hydrophobe Seitengruppen an der Grenzfläche zur Luft exponiert und polare Gruppen davon abgewandt werden. Aufgrund fehlender Interaktionspartner (*missing neighbour effects*), welche bei ungesättigten polaren Gruppen einen größeren energetischen Einfluss haben als bei hydrophoben, würde diese Ausrichtung die freie Energie an der Grenzfläche Polymer-Luft minimieren (Tretinnikov & Tamada, 2001). Bei Filmen mit höherem β -Faltblatt-Anteil sind hingegen die Freiheitsgrade der Moleküle beschränkt, so dass hier vergleichsweise mehr hydrophile Seitenketten oberflächenexponiert vorliegen. Dementsprechend resultiert daraus ein kleinerer Benetzungswinkel bei Aufbringen auf hydrophobe Substrate und ein größerer Benetzungswinkel – entsprechend einer hydrophoberen Oberfläche – des Proteinfilms auf Glassubstrat.

In Anlehnung an Polymerchemie kann eADF4(C16) aufgrund seiner amphiphilen Eigenschaften auch als Block-Copolymer betrachtet werden. Daher können die vorliegenden Ergebnisse auch unter diesem Gesichtspunkt interpretiert werden.

Bei Systemen aus zwei chemisch verschiedenen Molekülklassen oder Phasen A und B erfolgt meist eine teilweise Entmischung und die Ausbildung von Mesophasen. Je nach Mischungsverhältnis bzw. Volumenanteil der Phasen A und B werden unterschiedliche Anordnungen

eingenommen. Dazu gehören sphärische Strukturen (je nach Volumenverhältnis von A in einer Matrix aus B oder umgekehrt), zylindrische Strukturen oder bei annähernd gleicher Volumenverteilung von A und B Lamellen (Matsen & Bates, 1996; Rabotyagova *et al.*, 2011). Betrachtet man β -Faltblatt-Strukturen, welche bei Seidenproteinen vorwiegend aus unpolaren bzw. hydrophoben Aminosäuren gebildet werden, als Phase A und helikale bzw. ungeordnete Strukturen, welche eher polare und geladene Aminosäuren enthalten, als Phase B, wären auch hier unterschiedliche Anordnungen denkbar. Bei hohem Anteil an β -Faltblättern stellen diese die „Matrix“ dar, während sich hydrophilere Bereiche aufgrund besserer Interaktionsmöglichkeiten zusammenlagern. An der Grenzschicht zu Luft würden sich die Moleküle dann so ausrichten, dass die polaren, hydrophileren Bereiche der Luft zugewandt sind, da sie kaum über Wechselwirkungen mit den Molekülen der Filmmatrix stabilisiert werden. Umgekehrt würden sie sich bei einer Filmmatrix aus eher polaren Gruppen dem Film zuwenden, wohingegen hydrophobere Seitenketten an der Grenzfläche exponiert würden (Abb. 4.2). Hinzu kommt, dass bei einem niedrigerem β -Faltblatt-Anteil mehr unpolare Aminosäuren in flexibler Struktur vorliegen und somit oberflächenaktiv angeordnet werden können, wohingegen ein Großteil der hydrophoben Reste in unflexiblen β -Strukturen integriert sind.

Ähnliche Strukturen wurden kürzlich in einem Modell zur Anordnung Spinnenseiden-ähnlicher Block-Copolymere in Langmuir-Blodgett Filmen mit einem hydrophoben Anteil von etwa 46 % vorgeschlagen. Auch hier wurde als Grundlage eine Phasenseparation der hydrophoben bzw. hydrophilen Blöcke vermutet (Krishnaji *et al.*, 2011).

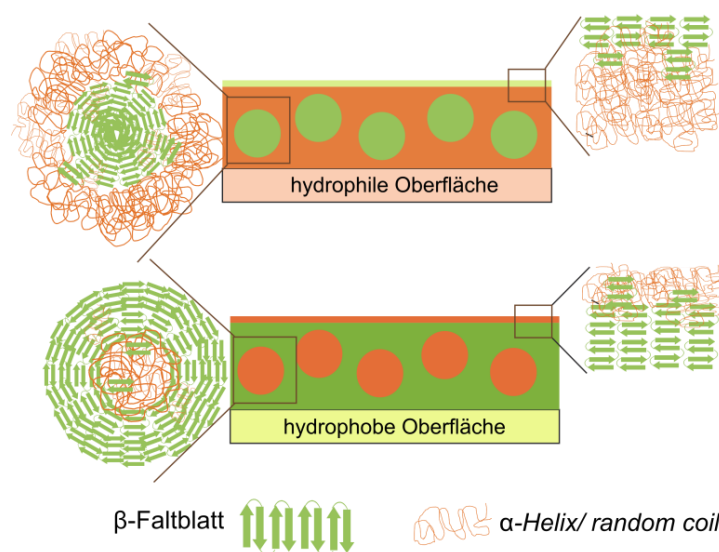


Abb. 4.2: Modell zum Einfluss des Substrats auf die Oberflächeneigenschaften einer eADF4(C16)-Beschichtung. Abhängig von der Hydrophobizität des Untergrundes ordnen sich die Moleküle unterschiedlich an und präsentieren unterschiedliche Seitenketten und/oder Strukturen an der Grenzfläche zur Luft (Wohlrab, Spiess *et al.*, in Vorbereitung)

Micellen-artige Strukturen konnten bisher mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie in Filmen gegossen auf Teflon beobachtet werden (Wohlrab, 2010). Allerdings war hier Fluorescein an eADF4(C16) gekoppelt, so dass diese Strukturen auch durch den Farbstoff bedingt sein können. Andererseits stellt dies ein Beispiel für Mesostrukturierung, induziert durch die chemische Natur des Moleküls, dar. Um eine Aussage über die Anordnung der Proteine im Film treffen zu können, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Des Weiteren wurde bei der hier angewendeten Messung der Sekundärstruktur nicht zwischen der Struktur in Grenzflächennähe bzw. im Filminneren unterschieden.

Ein Verständnis des zugrunde liegenden Mechanismus des beobachteten Oberflächeneffekts könnte erlauben, bestimmte Oberflächeneigenschaften gezielt durch Beschichtung mit eADF4(C16)-Filmen einzustellen.

4.5 Biokompatibilität von eADF4(C16) Filmen – *in vitro* Zellkultur-experimente

Ein vielversprechendes und breit diskutiertes Einsatzspektrum von Seidenmaterialien liegt im Bereich der Medizintechnik und des Tissue Engineering. Hier werden biokompatible, stabile, aber dennoch abbaubare Materialien als Gerüst gesucht, welche die Anheftung, Migration, Proliferation und Differenzierung der jeweiligen Zellen erlauben (Leal-Egana & Scheibel, 2010; Widhe *et al.*, 2010). Die Biokompatibilität von Materialien wird hauptsächlich durch zwei Faktoren bestimmt. Diese sind eine potentiell schädliche oder toxische Wirkung des Materials bzw. daraus freigesetzter Komponenten sowie die Interaktion des Materials mit Zellen (Anselme, 2000; Ramsden, 2008). So ist die Möglichkeit der Adhäsion für die meisten Zellarten nötig zum Überleben, während bei fehlender Interaktion Apoptose eingeleitet wird (Leal-Egana & Scheibel, 2010). Eine erfolgreiche Adhäsion umfasst die Zellanhaftung, -ausbreitung, Organisation des Cytoskeletts und die Ausbildung von fokalen Adhäsionen (LeBaron & Athanasiou, 2000) und beeinflusst die Fähigkeit der Zellen zu proliferieren und sich zu differenzieren (Anselme, 2000).

Sowohl *B. mori*-Seide als auch Spinnenseidenproteine gelten als vielversprechende Kandidaten, welche einen Großteil der Anforderungen erfüllen. So zeigen die natürlichen Proteine (bei *B. mori*-Seide nach Entfernen der Sericin-Hülle) keine bzw. geringe Toxizität und induzieren keine Immunantwort, werden langsam abgebaut und können funktionalisiert werden (Leal-Egana & Scheibel, 2010; Widhe *et al.*, 2010; Rising *et al.*, 2011; Murphy & Kaplan, 2009; Wang *et al.*, 2006). Natürliche Spinnenseidenfäden konnten kürzlich erfolgreich zur Regeneration peripherer Nerven in Ratten eingesetzt werden (Allmeling *et al.*,

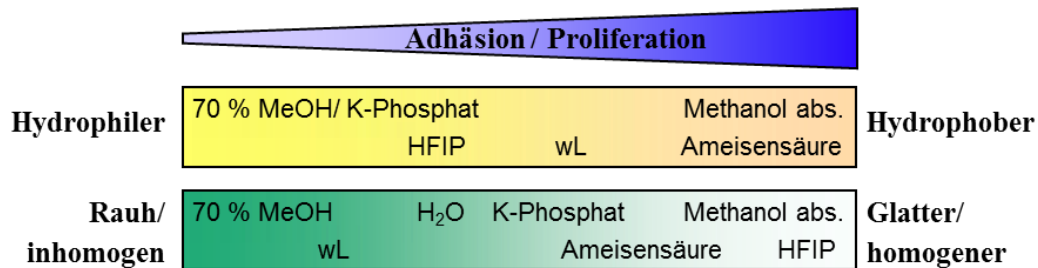
2008; Allmeling *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu dem natürlichen Faden lagen keine Daten über die Verträglichkeit des rekombinant hergestellten eADF4(C16) vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals Versuche zur Biokompatibilität von eADF4(C16) durchgeführt, welches dabei in Form von dünnen Filmen eingesetzt wurde.

Generell zeigten die hier untersuchten eADF4(C16)-Filme gute Biokompatibilität, wobei die Vitalität der untersuchten Zellen (murine fibroblastenartige Prä-Osteoblasten der Zelllinie MC3T3-E1) nach 48 h Kultivierung auf den Filmen zwischen 70 % und 110-120 % (im Vergleich zu speziell behandelten Zellkulturplatten) lag, und es somit keine Hinweise auf Cytotoxizität der Proteinfilme gab. Für die ersten Versuche wurden Filme aus verschiedenen Lösungsmitteln sowie unterschiedliche Nachbehandlungsmethoden getestet, auch wenn für spätere Anwendungen ein wässriges System zu bevorzugen ist, bei dem keine potentiell gesundheitsschädlichen Substanzen involviert sind.

Ein nachteiliger Einfluss der verwendeten Lösungsmittel konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Jedoch unterschieden sich die Anheftung und die Proliferation der Zellen je nach gewählten Parametern. Auf Ameisensäure-Filmen war das beste Zellwachstum zu beobachten, während auf Filmen aus HFIP und Pufferlösung (wL) eine Art *lag*-Phase auftrat. Möglicherweise werden von anfangs schwach adhärierten Zellen Proteine der Extrazellulären Matrix (ECM) sezerniert, was im Folgenden die Adhäsion sowie das Wachstum weiterer Zellen fördert (Ramsden, 2008). Beispielsweise wurde die vermehrte Produktion und Ablagerung von Kollagen Typ I durch verschiedene humane Zelllinien beobachtet, welche auf Seidenmaterialien kultiviert wurden (Kasoju *et al.*, 2009; Garcia, 2005). Denkbar wäre auch eine Umgestaltung (*remodeling*) der Filmoberfläche, beispielsweise durch Proteolyse, was die anschließende Anheftung weiterer Zellen erleichtert. Ein entsprechender Mechanismus wurde für die Bindung an Kollagen beschrieben (Schmidt & Friedl, 2010). Hinweise auf anfänglich zu wenige Adhäsionsmöglichkeiten geben die teilweise beobachteten extrem langen Zellfortsätze, welche eventuell ausgebildet werden, um große Distanzen zwischen guten Adhäsionsmöglichkeiten zu überbrücken.

Verschiedene Nachbehandlungsmethoden beeinflussten die Anheftung der Zellen ebenfalls. Während Inkubation mit reinem Methanol bzw. Ethanol oder Kaliumphosphatlösung zu Filmen mit guten, vergleichbaren Ergebnissen führte, war auf Filmen, die mit 70 % Alkohol nachbehandelt wurden, eine wesentlich schlechtere und inkonsistente Adhäsion zu beobachten. Durch mehrtägige Vorinkubation der Filme mit Medium ohne Zellen konnte ein negativer Effekt durch eventuell austretendes Lösungsmittel weitgehend ausgeschlossen werden. Die jeweiligen Filme wiesen nach Behandlung mit allen Methoden eine

vergleichbare Strukturzusammensetzung auf. Jedoch unterscheiden sie sich in ihrer Hydrophobizität (wobei der Benetzungswinkel an Luft bestimmt wurde) sowie ihrer Rauheit (Schema 4.3). Hierbei wiesen die mit 70 %-igem Alkohol nachbehandelten Filme die hydrophilste Oberfläche (im trockenen Zustand) und eine raue, inhomogene Topographie auf.



Schema 4.3: Vergleich der Hydrophobizität und Rauheit von verschiedenen nachbehandelten eADF4(C16) Filmen mit ihrer Eigenschaft, die Adhäsion bzw. Proliferation von MC3T3-E1 Zellen zu ermöglichen. Die angegebene Hydrophobizität bezieht sich auf Kontaktwinkelmessungen, welche an Luft durchgeführt wurden. In der oberen Zeile sind jeweils die Nachbehandlungsmethoden angegeben, in der unteren die Lösungsmittel.

Beide Parameter sind entscheidende Kriterien für eine erfolgreiche Zelladhäsion. Diese erfolgt am jeweiligen Untergrund entweder über nicht-spezifische Interaktionen oder Proteinvermittelt (Campillo-Fernandez *et al.*, 2009; Leal-Egana & Scheibel, 2010). Bei beiden Mechanismen spielt die Oberflächenchemie und die Hydrophobizität des Substrats eine wichtige Rolle, wobei hydrophobere Matrices die Adsorption von Serumproteinen, und damit nachfolgend die Adhäsion der Zellen, erleichtern (Campillo-Fernandez *et al.*, 2009). Die Aussagen über eine bevorzugte Hydrophobizität sind jedoch nicht eindeutig und unterscheiden sich je nach Zelltyp (Jeong *et al.*, 2009). Zellen der Linie MC3T3-E1 adhärten bevorzugt auf Peptid-beschichteten Mica-Oberflächen, welche Benetzungswinkel mit Wasser von etwa 60° aufwiesen (Qiu *et al.*, 2010). Ein ähnlicher Wert wurde für Methanol-behandelte eADF4(C16) Filme aus Ameisensäure bestimmt, auf welchen die höchste Zellproliferation gemessen wurde.

Auch die Topographie des Untergrundes beeinflusst die Adhäsion, Proliferation, Ausrichtung und Differenzierung von Zellen (Gil *et al.*, 2010b; Min *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2010). Auch hier fehlen jedoch allgemeingültige Aussagen. Generell gelten z. B. im Fall von Implantaten, welche intensiven Zellkontakt benötigen, rauere Oberflächen vorteilhafter als glatte. Hierbei wird eine Rauheit im Nanometer-Bereich (etwa 1 nm) genannt (Ramsden, 2008). In diesem Bereich liegen somit die glatteren der untersuchten eADF4(C16) Filme, wie etwa mit Methanol behandelte HFIP- und Ameisensäure-Filme. Bei Kultivierung von Zellen auf Substraten mit heterogener Oberflächenstrukturierung wurde zudem eine verzögerte Ausbildung fokaler Adhäsionspunkte auf den rauerer Bereichen beobachtet (Zinger *et al.*,

2004). Somit liegt eine mögliche Erklärung für die beobachteten Unterschiede der Zelladhäsion und -proliferation auf eADF4(C16) Filmen, welche verschiedenen Nachbehandlungsmethoden unterzogen wurden, in ihren jeweiligen Oberflächeneigenschaften.

In vivo wird das Zellverhalten durch die Zusammensetzung der ECM bestimmt, wobei neben spezifischen Interaktionen die mechanischen Eigenschaften des Untergrundes eine weitere, entscheidende Rolle spielen (Janmey *et al.*, 2009; Yeung *et al.*, 2005). Diese können im Fall von Proteinfilmen u. a. durch den Wassergehalt und die Sekundärstruktur beeinflusst werden, wobei ein höherer β -Faltblatt-Anteil in steiferen Matrices resultiert (Minoura *et al.*, 1990). Daher könnte eine unterschiedliche Elastizität der eADF4(C16) Filme ebenfalls einen kritischen Parameter darstellen; dies wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht analysiert.

Insgesamt war die Anheftung der Zellen an die untersuchten eADF4(C16)-Filme jedoch nicht dauerhaft. Nach Erreichen einer gewissen Konfluenz lösten sich die Zellen als Verbund vom Untergrund ab, was auf die Präsenz stärkerer anziehender Kräfte zwischen den Zellen (über Zell-Zell-Kontakte) als zum Untergrund hindeutet. Diese schwache Adhäsionskraft in Kombination mit der dennoch vorhandenen Biokompatibilität (bzw. fehlender cytotoxischer Wirkung) könnte für Anwendungen interessant sein, bei denen ein zu starkes Einwachsen von Zellen in ein Implantat nicht erwünscht ist, beispielsweise um einer Fibrosebildung vorzubeugen.

Zusätzlich konnte die Adhäsion der Zellen an die Filme durch Anbringen eines zyklischen RGD-Peptids verbessert werden. Dieses Aminosäuremotiv (RGD) ist Bestandteil vieler Integrin-Erkennungsstellen in der ECM und wurde daher bereits erfolgreich zur Optimierung der Zelladhäsion durch spezifische Integrin-vermittelte Interaktion eingesetzt (Hersel *et al.*, 2003; Ruoslahti, 1996). Kopplung des Peptids an gelöstes Protein mit anschließender Assemblierung in den Film erwies sich als effektiver für verbesserte Zelladhäsion als nachträgliche Kopplung an den Film. Die Wirksamkeit des Peptids hängt einerseits von seiner Erreichbarkeit und Flexibilität an der Oberfläche ab, um an die entsprechende Bindestelle im Integrin zu gelangen. Als zweiter entscheidender Faktor wurde die Menge bzw. Dichte des Peptids sowie seine räumliche Anordnung beschrieben (Hersel *et al.*, 2003; Duneau *et al.*, 2006). Ausgehend von der für die nachträgliche Kopplung von Nanogold ermittelten Dichte (185 fmol/cm^2) liegt die Menge an RGD-Peptid im unteren Bereich der als effektiv beschriebenen Moleküldichte (Shin *et al.*, 2003). Demnach spricht die stärker adhäsionsfördernde Wirkung des in Lösung gekoppelten RGD-Peptids für eine höhere Verfügbarkeit des Peptids an der Oberfläche. In weiterführenden Arbeiten sollte daher die optimale Dichte und Anordnung (z. B. über Mischungsverhältnisse des gekoppelten Proteins mit nicht-

modifiziertem eADF4(C16)) untersucht werden. Dass auch die Kopplung von Fluorescein alleine die Zellanhaftung in gewissem Umfang begünstigte, kann vermutlich auf die dadurch erzeugte, stärkere Hydrophobizität der Filmoberfläche zurückgeführt werden (s. oben).

4.6 Eigenschaften und Potential der untersuchten Spinnenseidenfilme im Vergleich zu *B. mori* Seidenfibroin-Filmen bzw. anderen Materialien

Die mechanischen Eigenschaften der hier untersuchten eADF4(C16)-Filme variierten in Abhängigkeit des verwendeten Lösungsmittels sowie der Nachbehandlung. Generell erwiesen sich die Filme mit einer Steifigkeit von 2-4 GPa und einer maximalen Zugfestigkeit im Bereich von 40-70 MPa als mechanisch belastbar, jedoch wenig dehnbar. Diese mechanischen Grundcharakteristika bleiben bis zu Temperaturen von 180-210 °C erhalten. Oberhalb dieser Temperatur steigt die Beweglichkeit der Moleküle und das Material erweicht. Die thermische Zersetzung der Filme schließlich beginnt etwas unterhalb von 300 °C und zeigt seinen maximalen Peak um 330 °C. Entscheidend für die hohe Temperatur-Beständigkeit der eADF4(C16)-Filme ist v. a. die charakteristische Sekundärstruktur der Proteine, da bei Protein-basierten Materialien mit einem hohen α -Helix-Anteil (z. B. Keratin) bereits ab 200 °C die Denaturierung der Helices beobachtet wird (Srinivasan *et al.*, 2010).

Mit diesen Eigenschaften liegen die eADF4(C16)-Filme im Bereich von Polylactonsäure (PLA) oder biologisch abbaubaren Polyamiden (PA6), wobei sie jedoch eine deutlich höhere Glasübergangstemperatur und somit unveränderte mechanische Integrität bis zu höheren Temperaturen besitzen (s. Tabelle 4.1). Verglichen zu Filmen aus Polylactid-co-Glycolid (PLGA) oder Proteinen wie Kollagen oder Soja, welche in der Medizin bzw. Nahrungsmittel-industrie Verwendung finden, sind sie deutlich zugfester, jedoch auch spröder (s. Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Mechanische und thermische Kennwerte ausgewählter Materialien. TZers.: Zersetzungstemperatur, T_g: Glasübergangstemperatur. n.a.: nicht angegeben

Material	Zugfestig- keit	Bruch- dehnung	E-Modul	T _{Zers.}	T _g	Referenz
	MPa	%	GPa	°C	°C	
eADF4(C16)	40-71 [#]	1,7-3	2,4-3,8	285-336	195-210	diese Arbeit
eADF4(C16) + 40% Glycerin , nachbeh. mit 50% MeOH	12	100	0,04	n. a.	n. a.	(Lammel, 2010)
B. mori Seidenfibroin (SF) , regeneriert	24 -30	1,7-1,9	2,9-3,4	270-298	178	(Vasconcelos <i>et al.</i> , 2008; Lawrence <i>et al.</i> , 2010; Jin <i>et al.</i> , 2005)
SF/Keratin Blend (mit 40-50% Keratin-Anteil)	9,1-17,8	1,2-2,2	1,4-20	264-298	185	(Vasconcelos <i>et al.</i> , 2008)
Tropoelastin (rekombinant, human)	n. a.	n. a.	$7,2 \times 10^{-3}$ (Nanoindentation)	310	190	(Hu <i>et al.</i> , 2010)
Kollagen	0,5 ^a -4,2 ^b	45-56 ^c	1,2-4,0 $\times 10^{-3}$ (a, c)	n. a.	n. a.	^a (Zorlutuna <i>et al.</i> , 2009) ^c (Sheu <i>et al.</i> , 2001; Charulatha & Rajaram, 2003)
Keratin (Schwamm)	0,05	17-19	n. a.	200-250 [‡]	n. a.	(Vasconcelos <i>et al.</i> , 2008; Srinivasan <i>et al.</i> , 2010)
Soja (Proteinisolat)	1,2-4,1	105-186	0,1	n. a.	n. a.	(Guerrero <i>et al.</i> , 2010; Pruneda <i>et al.</i> , 2008)
PLA (Polylactonsäure)	65	6,7	1,5-2,7	173-178 (Schmelzen)	60-65	(Armentano <i>et al.</i> , 2010; Cheung <i>et al.</i> , 2008)
PLGA (Polylactid-co-Glycolid) [†]	0,5-5	43-56	1,4-2,8	n.b.	50-55	(Lammel <i>et al.</i> , 2011; Armentano <i>et al.</i> , 2010)
PA6 (Polyamid6)	58	17	1,5	227	n.b.	(Liu <i>et al.</i> , 2003)

[†] je nach Mischungsverhältnis:50/50, 85/15, 90/10; [‡] Denaturierung der α -Helix; [#] je nach Lösungsmittel und Nachbehandlung

Verglichen mit Filmen aus regeneriertem *B. mori* Seidenfibroin ergeben sich ähnliche Charakteristika, wie z. B. mechanische Grundeigenschaften und molekulare Vorgänge unter thermischer Belastung. Allerdings weisen die hier untersuchten eADF4(C16)-Filme bei entsprechender Dehnbarkeit sowohl höhere Steifigkeit und Zugfestigkeit, als auch höhere Temperaturbeständigkeit auf.

Ursachen dafür sind vermutlich in der Primär- sowie Sekundärstruktur beider Proteinsysteme zu finden. eADF4(C16) besitzt weniger Ladungen (ausschließlich negative) und etwas geringere Hydropathizität als die schwere Kette des *B. mori* Seidenfibroins (SF), jedoch bei einem wesentlich geringeren Molekulargewicht. Dabei ist zu beachten, dass größere Kettenlängen prinzipiell mit höherer mechanischer Stabilität einhergehen. Auch bestehen Filme aus regeneriertem SF normalerweise aus einer Mischung der schweren und leichten Kette sowie P25, wohingegen in eADF4(C16)-Filmen nur eine Proteinkomponente vorliegt. Unterschiede finden sich zudem in der Aminosäuresequenz, insbesondere für die Ausbildung der hochgeordneten β -Faltblatt-Strukturen. Diese kristallinen Bereiche werden in SF durch das Aminosäuremotiv (GAGAGS)_n gebildet, in ADF4 und dem rekombinanten eADF4(C16)

hingegen v. a. durch A_n (Vepari, 2007; Heim *et al.*, 2009; Bini *et al.*, 2004; Huemmerich *et al.*, 2004a). Zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Alaninresten könnten dabei einen Zugewinn an Stabilität bewirken. In dem jeweiligen natürlichen Faden beider Seidentypen wurde zudem eine unterschiedliche Anordnung der β -Faltblätter beobachtet. So enthält *B. mori* Seide mehr kristalline Bereiche, während in *dragline* Seide ein höherer Anteil freier (nicht in kristallinen Bereichen angeordnet) β -Strukturen zu finden ist (Du *et al.*, 2011). Neben den postulierten Auswirkungen auf mechanische Charakteristika der Fäden (Du *et al.*, 2011) könnten ähnliche strukturelle Unterschiede auch bei Filmen deren Mechanik beeinflussen.

Insgesamt zeichnen sich die hier untersuchten eADF4(C16)-Filme durch die rekombinante, und damit monodisperse Produktion der zugrunde liegenden Moleküle und ihre reproduzierbare Herstellung sowie variable Prozessierungsmöglichkeiten aus. Über die Wahl und Kombination verschiedener Parameter während der Filmbildung können dessen Eigenschaften gesteuert werden. Die Sekundärstruktur der Proteine im Film wird dabei stark vom verwendeten Lösungsmittel, der Nachbehandlung sowie Umgebungsparametern kontrolliert. Gerade das Lösungsmittel führt zu Unterschieden, welche auch nach Nachbehandlung noch Auswirkungen z. B. auf das mechanische Verhalten zeigen. Insofern ist ein Verständnis der molekularen Anordnung und Vorgänge ein wichtiges Kriterium zur Herstellung von Filmen mit passgenauen Eigenschaften. Während makroskopische Eigenschaften wie Oberflächentopographie oder die chemische Beständigkeit durch die Wahl des Lösungsmittels und der Nachbehandlungsmethode variiert werden können, lassen sich Faktoren wie die Dehnbarkeit der Filme nur innerhalb eines engen Fensters beeinflussen. Jedoch kann durch Zusatz von Weichmachern, wie Glycerin oder PEG, die Dehnbarkeit der Filme auf $\geq 100\%$ gesteigert werden (Lammel, 2010; Spiess *et al.*, 2010a). Auch ist eine deutliche Änderung der mechanischen Eigenschaften bei höherer Luftfeuchtigkeit bzw. unter Wasser zu erwarten, was im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht ausführlich getestet wurde. Über verschiedene Methoden wie *salt leaching* oder Zusatz von PEG können zudem Poren einer definierten Größe in den Filmen erzeugt oder dreidimensionale *Scaffolds* (Gerüste) hergestellt werden (Spiess *et al.*, 2010a; Lammel, 2010; Teßmar *et al.*, 2005). Ein Einsatz solcher Strukturen oder der Filme selbst für direkten Zellkontakt und Geweberegenerierung scheint realisierbar, da sich in ersten Versuchen eine gute Biokompatibilität der Filme zeigte.

Die Möglichkeit, Materialien mittels ausschließlich auf wässrigen Lösungsmitteln basierenden Prozessen herzustellen, ist ein weiterer entscheidender Vorteil. Spinnenseidenfilme konnten aus wässriger Lösung assembliert werden, und eine

Nachbehandlung mit Kaliumphosphat führt zu einer Zunahme an β -Faltblatt-Struktur und damit zu einer höheren mechanischen und chemischen Stabilität. Allerdings zeigten die Filme – zumindest ab einer gewissen Größe – sowohl strukturelle als auch makroskopische Inhomogenität. Um bei diesem System reproduzierbar homogene Filme zu erhalten, sollte der Herstellungsprozess weiter optimiert werden.

Schließlich bieten die Filme die Möglichkeit einer Vielfalt von Funktionalisierungen. Als rekombinant hergestelltes Protein kann eADF4(C16) gezielt genetisch und auch chemisch modifiziert werden, was in dieser Arbeit durch Kopplung diverser Molekülklassen an Cystein-Mutanten von eADF4(C16) demonstriert wurde.

Mit diesen Eigenschaften stellen Spinnenseidenfilme basierend auf eADF4(C16) interessante Materialien dar, die sich einerseits durch inhärente Eigenschaften der Spinnenseide – wie mechanische und thermische Stabilität sowie Biokompatibilität – auszeichnen, andererseits durch ihre Flexibilität in der Prozessierung sowie vielfältige Funktionalisierbarkeit auf verschiedenste Anwendungen angepasst werden können.

5 Zusammenfassung

Spinnenseide stellt aufgrund ihrer außergewöhnlichen mechanischen und chemischen Eigenschaften ein faszinierendes, Protein-basiertes Material mit Potential für vielfältige Anwendung in technischen und biomedizinischen Bereichen dar. Rekombinant hergestellte Spinnenseidenproteine können neben der natürlichen Assemblierungsform des Fadens zu diversen Morphologien, wie Vliesen, Mikropartikeln, Kapseln oder Filmen verarbeitet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Filme aus dem rekombinant produzierten Protein eADF4(C16) umfassend charakterisiert. eADF4(C16) leitet sich von der repetitiven Kerndomäne des Proteins ADF4 ab, welches ein Hauptbestandteil der sog. *dragline* Seide der Europäischen Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* ist. Der Einfluss verschiedener Prozessparameter auf bestimmte Eigenschaften des resultierenden Films wurde systematisch untersucht. Die Variablen umfassten dabei die Wahl des Lösungsmittels zum Gießen des Films (hierbei kamen die organischen Lösungsmittel Hexafluoroisopropanol, Ameisensäure sowie ein wässriges Puffersystem zum Einsatz), die Art der Nachbehandlung (Methanol bzw. Ethanol jeweils 70 % oder 100 % sowie Kaliumphosphatlösung), sowie die relative Luftfeuchtigkeit.

Alle Parameter zeigten dabei einen Einfluss auf die Sekundärstruktur der Proteine im Film. Zusätzlich wurden die thermische, chemische und mechanische Stabilität der Filme sowie ihre Oberflächeneigenschaften analysiert. Während sich alle untersuchten Filme kaum in ihrer thermischen Stabilität (bestimmt mittels DSC und TGA) unterschieden, zeigte sich ein deutlicher Einfluss des verwendeten Lösungsmittels und der Nachbehandlung auf die chemische Beständigkeit und das mechanische Verhalten der Filme unter linearer Zugbelastung. Chemische und mechanische Eigenschaften konnten mit der Sekundärstruktur-Zusammensetzung korreliert werden. Aus Zugversuchen, dynamisch mechanischer Analyse sowie einer Kombination aus linearer Zugbelastung und gleichzeitiger FTIR-Analyse konnte geschlossen werden, dass das verwendete Lösungsmittel nicht nur die Zusammensetzung der Sekundärstruktur beeinflusst, sondern auch die Vernetzung/Anordnung der einzelnen Strukturelemente. Dieser Einfluss überdauerte auch die Nachbehandlung der Filme.

Alle untersuchten Nachbehandlungsarten führten zu einer Erhöhung des β -Faltblattanteils. Allerdings konnte ein Effekt der gewählten Methode auf die Oberflächenbeschaffenheit der nachbehandelten Filme festgestellt werden: Die jeweiligen Filme unterschieden sich sowohl in ihrer Topographie als auch in ihrer Hydrophobizität. Das zum Gießen verwendete

Lösungsmittel zeigte dabei nur einen minimalen Einfluss, mit Ausnahme des wässrigen Systems, welches bei der angewendeten Gießmethode zu heterogenen Filmen führte.

Für viele Anwendungen sind zusätzliche Funktionalisierungen, z. B. mit gezielten Effektormolekülen, vorteilhaft oder gar notwendig. Hierfür wurde die Methode der post-translationalen chemischen Kopplung gewählt. Um eine chemisch spezifische Reaktionsstelle bereitzustellen, wurden Cystein-Mutanten des Proteins eADF4(C16) hergestellt. Da in der Originalsequenz keine Thiole vorhanden sind, sollte die neu eingeführte Thiolgruppe eine spezifische, kontrollierte und einfache Kopplung weiterer Moleküle ermöglichen. Drei verschiedene Proteinvarianten wurden gereinigt und charakterisiert. Die Untersuchung ihrer Sekundärstruktur in Lösung und in assemblierten Filmen ergab keine signifikanten Änderungen im Vergleich zu eADF4(C16). Zusätzlich konnten die Proteine sowohl in Lösung als auch nach Filmbildung in einer spezifischen Reaktion mit hoher Effizienz modifiziert werden. Um die Variabilität der Funktionalisierung zu zeigen, wurde die kovalente Kopplung von Fluorescein, Biotin und Nanogold durchgeführt. Des Weiteren konnte das Enzym β -Galaktosidase unter Beibehaltung seiner Aktivität immobilisiert werden. Für spätere Zellkulturanalysen wurde zudem eine RGD-Sequenz in Form eines zyklischen Peptids gekoppelt, die eine Integrin-vermittelte Zelladhäsion ermöglicht.

Im Hinblick auf potentielle Anwendungen der rekombinanten Spinnenseidenfilme als Beschichtung technischer Materialien wurden die Oberflächeneigenschaften der jeweiligen Filme analysiert. Dabei zeigte sich, dass besonders die Benetzbarkeit bzw. Hydrophobizität der Filmoberfläche in Abhängigkeit des verwendeten Substrats variierte. Auf hydrophoben Materialien (Polystyrol und Teflon) wiesen dünne Filme eine hydrophile Oberfläche auf, während Filme auf Glas hydrophobe Eigenschaften zeigten. Gleichzeitig konnten Unterschiede in der Sekundärstruktur der Filme nachgewiesen werden. In Anlehnung an Theorien für Block-Copolymere wurde ein Modell über eine mögliche Anordnung der Strukturelemente in diesen Filmen aufgestellt, um die beobachteten Oberflächeneffekte zu erklären.

Natürliche Seidenmaterialien stellen aufgrund ihrer guten Biokompatibilität und ihrer biologischen Abbaubarkeit auch interessante Kandidaten für biomedizinische Applikationen dar. Daher wurde die biologische Verträglichkeit der rekombinanten Spinnenseidenfilme *in vitro* untersucht. Erste Ergebnisse ergaben prinzipiell eine gute Verträglichkeit des Materials; so adhärten Prä-Osteoblasten (MC3T3-E1) auf den Filmen und konnten über mehrere Tage kultiviert werden. Das zum Gießen verwendete Lösungsmittel und v. a. die Nachbehandlungsart beeinflussten signifikant das Resultat, was möglicherweise auf die

unterschiedliche Oberflächenchemie und -topographie zurückzuführen ist. Während die Adhäsion der Zellen auf nicht-modifizierten Filmen schwach war, konnte diese durch Kopplung der spezifischen Zelladhäsions-Sequenz c(RGDfK) verbessert werden.

Insgesamt gibt die Arbeit einen Überblick darüber, wie bestimmte Eigenschaften rekombinanter Spinnenseidenfilme über Prozessparameter beeinflusst werden können. Die gezeigten Zusammenhänge lassen Rückschlüsse auf die Verknüpfung von Struktur und Funktion zu, welche die Grundlage für weiterführende Untersuchung in Richtung gezielter Anwendungen darstellen. Die Möglichkeit, Seidenfilme spezifisch und kontrolliert zu modifizieren, sowie ihre prinzipielle Biokompatibilität deuten auf vielfältige Anwendungsmöglichkeiten rekombinanter Spinnenseidenfilme sowohl im technischen als auch im biologischen und biomedizinischen Bereich hin.

6 Summary

Due to their extraordinary mechanical and biochemical properties, spider silks represent fascinating protein-based materials which are promising candidates for versatile biomedical and technical applications. *In vivo*, fibers are formed from silk proteins. *In vitro*, however, recombinantly produced spider silk proteins can be assembled into different morphologies, including particles, capsules, non-wovens or films.

Here, films made of the recombinant spider silk protein eADF4(C16), which is based on the sequence of the repetitive core domain of the *dragline* silk protein ADF4 of the European garden spider *Araneus diadematus*, are characterized. The influence of different processing parameters including the initial solvent of the protein (hexafluoroisopropanol, formic acid and aqueous solution), the used post-treatment method (methanol and ethanol, 70 % or 100 % each, as well as potassium phosphate) and relative humidity on distinct film properties are systematically studied.

While all tested parameters influenced the secondary structure of the proteins within the films, they had no remarkable effect on the films' thermal stability, as determined by DSC and TGA measurements. In contrast, chemical stability and mechanical characteristics revealed a clear dependence on the initial solvent and post-treatment, and could be correlated with the secondary structure content in the film. Tensile testing, dynamic mechanical analysis, as well as combined polarized IR spectroscopy and mechanical analysis indicated an influence of the initial solvent not only on the presence but also on the arrangement of secondary structure elements, with the effect being sustained even after methanol treatment.

Analysis of surface characteristics of the different films revealed an influence of the tested post-treatment procedures on the films' topography and hydrophobicity. In contrast, the initial solvent only showed minor effects, except for the aqueous system, which led to heterogeneous films upon the employed casting method.

For many applications, additional specific functionalization with external effector molecules is necessary or beneficial. Therefore, post-translational chemical coupling was chosen. In order to provide a reaction site for specific and controlled functionalization, cysteine containing variants of eADF4(C16), which normally does not contain cysteine residues, were produced. Three different cysteine variants, containing a single cysteine each, were characterized in terms of secondary structure, assembly and chemical reactivity in solution. Their structural characteristics were comparable to the original cysteine-free protein both in solution and in assembled films. Further, the proteins in solution as well as in cast films could

be easily modified. Chemical coupling with molecules like nanogold, fluorescein, biotin or β -galactosidase demonstrates the possible site-selective functionalization of silk films. Additionally, a cyclic RGD-peptide was added to the films in order to enable integrin-mediated cell adhesion in subsequent biocompatibility tests.

With respect to potential future applications of the spider silk films, different technically important hydrophobic (polystyrene and Teflon) and hydrophilic (glass) substrates were coated with eADF4(C16). As critical parameters, surface properties like topography and wettability were analyzed. It was shown that especially the wettability of thin silk films depended on the chosen substrate, with intrinsically hydrophobic substrates revealing a hydrophilic film surface and vice versa. Additionally, changes in the secondary structure of the proteins were observed in these different films. Therefrom, a model concerning the arrangement of the proteins/protein motifs within the film was derived, according to basic principles of block-copolymer chemistry.

Due to the biocompatibility of natural silks, silk materials are interesting candidates for use in medical applications. Therefore, the biocompatibility of eADF4(C16) films was investigated. Pre-osteoblasts (MC3T3-E1) could be cultured on the silk films for several days revealing no adverse effects. The initial solvent used for film preparation and the used post-treatment method influenced cell behavior, which can probably be attributed to differences in surface chemistry and topography of the respective films. However, adhesion of the cells on non-modified films seemed to be weak, which could be improved by coupling of the cyclic RGD-peptide c(RGDfK) to the films.

Overall, this work provides information about how distinct properties of recombinant spider silk films may be influenced and controlled by varying processing parameters. The results reveal insights into the structure-function-relationship of silk proteins in such films, which provides basic knowledge for future investigations directed to specific applications thereof. The possibility of versatile functionalizations in combination with their general biocompatibility indicates a high potential for several applications of films made of recombinant spider silk proteins in technical as well as biomedical fields.

7 Literatur

- Aboushwareb, T., Eberli, D., Ward, C., Broda, C., Holcomb, J., Atala, A. and Van Dyke, M. (2009) A keratin biomaterial gel hemostat derived from human hair: evaluation in a rabbit model of lethal liver injury. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, **90**, 45-54.
- Ackbarow, T. and Buehler, M. J. (2009) Alpha-helical protein domains unify strength and robustness through hierarchical nanostructures. *Nanotechnology*, **20**, 075103.
- Ackbarow, T., Chen, X., Keten, S. and Buehler, M. J. (2007) Hierarchies, multiple energy barriers, and robustness govern the fracture mechanics of alpha-helical and beta-sheet protein domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 16410-16415.
- Adler-Abramovich, L., Reches, M., Sedman, V. L., Allen, S., Tendler, S. J. B. and Gazit, E. (2006) Thermal and Chemical Stability of Diphenylalanine Peptide Nanotubes: Implications for Nanotechnological Applications. *Langmuir*, **22**, 1313-1320.
- Adolphi, U. and Kulicke, W. M. (1997) Coil dimensions and conformation of macromolecules in aqueous media from flow field-flow fractionation/multi-angle laser light scattering illustrated by studies on pullulan. *Polymer*, **38**, 1513-1519.
- Agapov, I., Pustovalova, O., Moisenovich, M., Bogush, V., Sokolova, O., Sevastyanov, V., Debabov, V. and Kirpichnikov, M. (2009) Three-dimensional scaffold made from recombinant spider silk protein for tissue engineering. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, **426**, 127-130.
- Agarwal, N., Hoagland, D. A. and Farris, R. J. (1997) Effect of moisture absorption on the thermal properties of Bombyx mori silk fibroin films. *Journal of Applied Polymer Science*, **63**, 401-410.
- Allmeling, C., Jokuszies, A., Reimers, K., Kall, S., Choi, C. Y., Brandes, G., Kasper, C., Scheper, T., Guggenheim, M. and Vogt, P. M. (2008) Spider silk fibres in artificial nerve constructs promote peripheral nerve regeneration. *Cell Proliferation*, **41**, 408-420.
- Allmeling, C., Jokuszies, A., Reimers, K., Kall, S. and Vogt, P. M. (2006) Use of spider silk fibres as an innovative material in a biocompatible artificial nerve conduit. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **10**, 770-777.
- Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J. S., Lu, H., Richmond, J. and Kaplan, D. L. (2003) Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, **24**, 401-416.
- Amsden, J. J., Domachuk, P., Gopinath, A., White, R. D., Negro, L. D., Kaplan, D. L. and Omenetto, F. G. (2010) Rapid nanoimprinting of silk fibroin films for biophotonic applications. *Adv Mater*, **22**, 1746-1749.
- Amsden, J. J., Perry, H., Boriskina, S. V., Gopinath, A., Kaplan, D. L., Dal Negro, L. and Omenetto, F. G. (2009) Spectral analysis of induced color change on periodically nanopatterned silk films. *Optics Express*, **17**, 21271-21279.
- Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, **181**, 223-230.
- Anfinsen, C. B., Haber, E., Sela, M. and White, F. H., Jr. (1961) The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **47**, 1309-1314.
- Anselme, K. (2000) Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, **21**, 667-681.
- Armentano, I., Dottori, M., Fortunati, E., Mattioli, S. and Kenny, J. M. (2010) Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polymer Degradation and Stability*, **95**, 2126-2146.
- Askarieh, G., Hedhammar, M., Nordling, K., Saenz, A., Casals, C., Rising, A., Johansson, J. and Knight, S. D. (2010) Self-assembly of spider silk proteins is controlled by a pH-sensitive relay. *Nature*, **465**, 236-238.
- Augsten, K., Muhlig, P. and Herrmann, C. (2000) Glycoproteins and skin-core structure in Nephila clavipes spider silk observed by light and electron microscopy. *Scanning*, **22**, 12-15.
- Ayoub, N. A., Garb, J. E., Tinghitella, R. M., Collin, M. A. and Hayashi, C. Y. (2007) Blueprint for a high-performance biomaterial: full-length spider dragline silk genes. *PLoS ONE*, **2**, e514.

- Baldwin, R. L. (1996) How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophysical Journal*, **71**, 2056-2063.
- Baoyong, L., Jian, Z., Denglong, C. and Min, L. (2010) Evaluation of a new type of wound dressing made from recombinant spider silk protein using rat models. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*, **36**, 891-896.
- Barth, A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1767**, 1073-1101.
- Baumann, L., Kaufman, J. and Saghari, S. (2006) Collagen fillers. *Dermatologic therapy*, **19**, 134-140.
- Becker, N., Oroudjev, E., Mutz, S., Cleveland, J. P., Hansma, P. K., Hayashi, C. Y., Makarov, D. E. and Hansma, H. G. (2003) Molecular nanosprings in spider capture-silk threads. *Nat Mater*, **2**, 278-283.
- Bettinger, C. J., Cyr, K. M., Matsumoto, A., Langer, R., Borenstein, J. T. and Kaplan, D. L. (2007) Silk fibroin microfluidic devices. *Advanced Materials*, **19**, 2847-+.
- Bini, E., Foo, C. W. P., Huang, J., Karageorgiou, V., Kitchel, B. and Kaplan, D. L. (2006) RGD-functionalized bioengineered spider dragline silk biomaterial. *Biomacromolecules*, **7**, 3139-3145.
- Bini, E., Knight, D. P. and Kaplan, D. L. (2004) Mapping domain structures in silks from insects and spiders related to protein assembly. *J Mol Biol*, **335**, 27-40.
- Binnig, G., Quate, C. F. and Gerber, C. (1986) Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, **56**, 930-933.
- Blanch, E. W., Gill, A. C., Rhie, A. G. O., Hope, J., Hecht, L., Nielsen, K. and Barron, L. D. (2004) Raman optical activity demonstrates poly(L-proline) II helix in the N-terminal region of the ovine prion protein: Implications for function and misfunction. *Journal of Molecular Biology*, **343**, 467-476.
- Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N. and Eccleston, G. M. (2008) Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *Journal of pharmaceutical sciences*, **97**, 2892-2923.
- Bozzola, J. J. and Russell, L. D. (1999) Electron microscopy: principles and techniques for biologists., *Jones and Bartlett Publishers*, Boston.
- Brewer, C. F. and Riehm, J. P. (1967) Evidence for possible nonspecific reactions between N-ethylmaleimide and proteins. *Analytical Biochemistry*, **18**, 248-255.
- Brockwell, D. J., Paci, E., Zinober, R. C., Beddard, G. S., Olmsted, P. D., Smith, D. A., Perham, R. N. and Radford, S. E. (2003) Pulling geometry defines the mechanical resistance of a beta-sheet protein. *Nat Struct Biol*, **10**, 731-737.
- Brown-Augsburger, P., Tisdale, C., Broekelmann, T., Sloan, C. and Mecham, R. P. (1995) Identification of an elastin cross-linking domain that joins three peptide chains. Possible role in nucleated assembly. *J Biol Chem*, **270**, 17778-17783.
- Buehler, M. J. and Yung, Y. C. (2009) Deformation and failure of protein materials in physiologically extreme conditions and disease. *Nat Mater*, **8**, 175-188.
- Campillo-Fernandez, A. J., Unger, R. E., Peters, K., Halstenberg, S., Santos, M., Salmeron Sanchez, M., Meseguer Duenas, J. M., Monleon Pradas, M., Gomez Ribelles, J. L. and Kirkpatrick, C. J. (2009) Analysis of the biological response of endothelial and fibroblast cells cultured on synthetic scaffolds with various hydrophilic/hydrophobic ratios: influence of fibronectin adsorption and conformation. *Tissue engineering. Part A*, **15**, 1331-1341.
- Cantor, C. R. and Schimmel, P. R. (1980) Biophysical Chemistry, *Freeman & Co.*, San Francisco.
- Cassinelli, C., Cascardo, G., Morra, M., Draghi, L., Motta, A. and Catapano, G. (2006) Physical-chemical and biological characterization of silk fibroin-coated porous membranes for medical applications. *International Journal of Artificial Organs*, **29**, 881-892.
- Challis, R. J., Goodacre, S. L. and Hewitt, G. M. (2006) Evolution of spider silks: conservation and diversification of the C-terminus. *Insect Mol Biol*, **15**, 45-56.
- Charulatha, V. and Rajaram, A. (2003) Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes. *Biomaterials*, **24**, 759-767.
- Chen, J. S., Altman, G. H., Karageorgiou, V., Horan, R., Collette, A., Volloch, V., Colabro, T. and Kaplan, D. L. (2003) Human bone marrow stromal cell and ligament fibroblast responses on RGD-modified silk fibers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **67A**, 559-570.

- Chen, K., Liu, Z., Zhou, C., Shi, Z. and Kallenbach, N. R. (2005) Neighbor effect on PPII conformation in alanine peptides. *Journal of the American Chemical Society*, **127**, 10146-10147.
- Chen, T.-H., Bae, Y. and Furgeson, D. (2008) Intelligent Biosynthetic Nanobiomaterials (IBNs) for Hyperthermic Gene Delivery. *Pharmaceutical research*, **25**, 683-691.
- Chen, X., Knight, D. P. and Vollrath, F. (2002) Rheological characterization of nephila spidroin solution. *Biomacromolecules*, **3**, 644-648.
- Chen, X., Shao, Z. Z. and Vollrath, F. (2006) The spinning processes for spider silk. *Soft Matter*, **2**, 448-451.
- Cheung, H.-Y., Lau, K.-T., Tao, X.-M. and Hui, D. (2008) A potential material for tissue engineering: Silkworm silk/PLA biocomposite. *Composites Part B: Engineering*, **39**, 1026-1033.
- Cleland, W. W. (1964) Dithiothreitol, a New Protective Reagent for Sh Groups. *Biochemistry*, **3**, 480-482.
- Cook, W. J., Trapane, T. L. and Prasad, K. U. (1985) Crystal structure and conformation of the cyclic tetramer of a repeat tripeptide of elastin, cyclo(L-valyl-L-prolylglycyl)₄. *International journal of peptide and protein research*, **25**, 481-486.
- Craig, C. L. (1997) Evolution of arthropod silks. *Annu Rev Entomol*, **42**, 231-267.
- Cranford, S. and Buehler, M. J. (2010) Materiomics: biological protein materials, from nano to macro. *Nanotechnol., Sci. Appl.*, **3**, 127-148.
- Csete, M. E. and Doyle, J. C. (2002) Reverse engineering of biological complexity. *Science*, **295**, 1664-1669.
- Daamen, W. F., Geutjes, P. J., van Moerkerk, H. T. B., Nillesen, S. T. M., Wismans, R. G., Hafmans, T., van den Heuvel, L. P. W. J., Pistorius, A. M. A., Veerkamp, J. H., van Hest, J. C. M. and van Kuppevelt, T. H. (2007) "Lyophilisomes": A New Type of (Bio)capsule. *Advanced Materials*, **19**, 673-677.
- Dalsin, J. L., Hu, B. H., Lee, B. P. and Messersmith, P. B. (2003) Mussel adhesive protein mimetic polymers for the preparation of nonfouling surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, **125**, 4253-4258.
- de Guzman, R. C., Merrill, M. R., Richter, J. R., Hamzi, R. I., Greengauz-Roberts, O. K. and Van Dyke, M. E. (2011) Mechanical and biological properties of keratose biomaterials. *Biomaterials*, **32**, 8205-8217.
- Deng, C., Chen, X., Yu, H., Sun, J., Lu, T. and Jing, X. (2007) A biodegradable triblock copolymer poly(ethylene glycol)-b-poly(l-lactide)-b-poly(l-lysine): Synthesis, self-assembly, and RGD peptide modification. *Polymer*, **48**, 139-149.
- Dicko, C., Kenney, J. M., Knight, D. and Vollrath, F. (2004) Transition to a beta-sheet-rich structure in spidroin in vitro: the effects of pH and cations. *Biochemistry*, **43**, 14080-14087.
- Domachuk, P., Perry, H., Amsden, J. J., Kaplan, D. L. and Omenetto, F. G. (2009) Bioactive "self-sensing" optical systems. *Applied Physics Letters*, **95**, -.
- Dreher, M. R., Raucher, D., Balu, N., Michael Colvin, O., Ludeman, S. M. and Chilkoti, A. (2003) Evaluation of an elastin-like polypeptide-doxorubicin conjugate for cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, **91**, 31-43.
- Du, N., Liu, X. Y., Narayanan, J., Li, L., Lim, M. L. and Li, D. (2006) Design of superior spider silk: from nanostructure to mechanical properties. *Biophys J*, **91**, 4528-4535.
- Du, N., Yang, Z., Liu, X. Y., Li, Y. and Xu, H. Y. (2011) Structural Origin of the Strain-Hardening of Spider Silk. *Advanced Functional Materials*, **21**, 772-778.
- Dunehoo, A. L., Anderson, M., Majumdar, S., Kobayashi, N., Berkland, C. and Siahaan, T. J. (2006) Cell adhesion molecules for targeted drug delivery. *Journal of pharmaceutical sciences*, **95**, 1856-1872.
- Ehrenstein, G. W., Riedel, G. and Trawiel, P. (1998) Praxis der Thermischen Analyse von Kunststoffen., *Carl Hanser Verlag*, München Wien.
- Eisoldt, L., Hardy, J. G., Heim, M. and Scheibel, T. R. (2010) The role of salt and shear on the storage and assembly of spider silk proteins. *J Struct Biol*, **170**, 413-419.

- Eisoldt, L., Thamm, C. and Scheibel, T. (2011) The role of terminal domains during storage and assembly of spider silk proteins. *Biopolymers*, Epub 2011 Nov 5, doi: 10.1002/bip.22006
- Ene, R., Papadopoulos, P. and Kremer, F. (2009) Combined structural model of spider dragline silk. *Soft Matter*, **5**, 4568-4574.
- Ene, R., Papadopoulos, P. and Kremer, F. (2010) Partial deuteration probing structural changes in supercontracted spider silk. *Polymer*, **51**, 4784-4789.
- Ene, R., Papadopoulos, P. and Kremer, F. (2011) Supercontraction in Nephila spider dragline silk – Relaxation into equilibrium state. *Polymer*, **52**, 6056-6060.
- Eom, K., Li, P.-C., Makarov, D. E. and Rodin, G. J. (2003) Relationship between the Mechanical Properties and Topology of Cross-Linked Polymer Molecules: Parallel Strands Maximize the Strength of Model Polymers and Protein Domains. *The Journal of Physical Chemistry B*, **107**, 8730-8733.
- Exler, J. H., Hummerich, D. and Scheibel, T. (2007) The amphiphilic properties of spider silks are important for spinning. *Angewandte Chemie-International Edition*, **46**, 3559-3562.
- Foo, C. W. P., Patwardhan, S. V., Belton, D. J., Kitchel, B., Anastasiades, D., Huang, J., Naik, R. R., Perry, C. C. and Kaplan, D. L. (2006) Novel nanocomposites from spider silk-silica fusion (chimeric) proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 9428-9433.
- Fox, L. R. (1975) Cannibalism in Natural Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **6**, 87-106.
- Franco, R. A., Min, Y.-K., Yang, H.-M. and Lee, B.-T. (2011) Fabrication and biocompatibility of novel bilayer scaffold for skin tissue engineering applications. *Journal of Biomaterials Applications*.
- Frank, B. P. and Belfort, G. (2002) Adhesion of Mytilus edulis Foot Protein 1 on Silica: Ionic Effects on Biofouling. *Biotechnology Progress*, **18**, 580-586.
- Freddi, G., Tsukada, M. and Beretta, S. (1999) Structure and physical properties of silk fibroin polyacrylamide blend films. *Journal of Applied Polymer Science*, **71**, 1563-1571.
- Fredriksson, C., Hedhammar, M., Feinstein, R., Nordling, K., Kratz, G., Johansson, J., Huss, F. and Rising, A. (2009) Tissue Response to Subcutaneously Implanted Recombinant Spider Silk: An in Vivo Study. *Materials*, **2**, 1908-1922.
- Frische, Maunsbach and Vollrath (1998) Elongate cavities and skin-core structure in Nephila spider silk observed by electron microscopy. *Journal of Microscopy*, **189**, 64-70.
- Fuchs, E. and Weber, K. (1994) Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem*, **63**, 345-382.
- Fudge, D. S., Gardner, K. H., Forsyth, V. T., Riek, C. and Gosline, J. M. (2003) The mechanical properties of hydrated intermediate filaments: insights from hagfish slime threads. *Biophys J*, **85**, 2015-2027.
- Garcia-Fuentes, M., Meinel, A. J., Hilbe, M., Meinel, L. and Merkle, H. P. (2009) Silk fibroin/hyaluronan scaffolds for human mesenchymal stem cell culture in tissue engineering. *Biomaterials*, **30**, 5068-5076.
- García, A. J. (2005) Get a grip: integrins in cell-biomaterial interactions. *Biomaterials*, **26**, 7525-7529.
- García, R. and Pérez, R. (2002) Dynamic atomic force microscopy methods. *Surface Science Reports*, **47**, 197-301.
- Gast, K., Siemer, A., Zirwer, D. and Damaschun, G. (2001) Fluoroalcohol-induced structural changes of proteins: some aspects of cosolvent-protein interactions. *Eur Biophys J*, **30**, 273-283.
- Gatesy, J., Hayashi, C., Motriuk, D., Woods, J. and Lewis, R. (2001) Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences. *Science*, **291**, 2603-2605.
- Gebhardt, K. E., Ahn, S., Venkatachalam, G. and Savin, D. A. (2007) Rod-Sphere Transition in Polybutadiene-Poly(l-lysine) Block Copolymer Assemblies. *Langmuir*, **23**, 2851-2856.
- Gil, E. S., Mandal, B. B., Park, S. H., Marchant, J. K., Omenetto, F. G. and Kaplan, D. L. (2010a) Helicoidal multi-lamellar features of RGD-functionalized silk biomaterials for corneal tissue engineering. *Biomaterials*, **31**, 8953-8963.

- Gil, E. S., Park, S. H., Marchant, J., Omenetto, F. and Kaplan, D. L. (2010b) Response of human corneal fibroblasts on silk film surface patterns. *Macromolecular Bioscience*, **10**, 664-673.
- Gill, S. C. and von Hippel, P. H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*, **182**, 319-326.
- Glisovic, A., Vehoff, T., Davies, R. J. and Salditt, T. (2008) Strain dependent structural changes of spider dragline silk. *Macromolecules*, **41**, 390-398.
- Gosline, J. M., Guerette, P. A., Ortlepp, C. S. and Savage, K. N. (1999) The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function. *J Exp Biol*, **202**, 3295-3303.
- Gotoh, Y., Tsukada, M., Baba, T. and Minoura, N. (1997) Physical properties and structure of poly(ethylene glycol)-silk fibroin conjugate films. *Polymer*, **38**, 487-490.
- Gray, W. R., Sandberg, L. B. and Foster, J. A. (1973) Molecular model for elastin structure and function. *Nature*, **246**, 461-466.
- Grubb, D. T. and Jelinski, L. W. (1997) Fiber morphology of spider silk: The effects of tensile deformation. *Macromolecules*, **30**, 2860-2867.
- Guan, J., Vollrath, F. and Porter, D. (2011) Two mechanisms for supercontraction in *Nephila* spider dragline silk. *Biomacromolecules*, **12**, 4030-4035.
- Guerette, P. A., Ginzinger, D. G., Weber, B. H. and Gosline, J. M. (1996) Silk properties determined by gland-specific expression of a spider fibroin gene family. *Science*, **272**, 112-115.
- Guerrero, P., Retegi, A., Gabilondo, N. and de la Caba, K. (2010) Mechanical and thermal properties of soy protein films processed by casting and compression. *Journal of Food Engineering*, **100**, 145-151.
- Guex, N. and Peitsch, M. C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, **18**, 2714-2723.
- Gurd, F. R. N. (1972) Carboxymethylation. In *Methods in Enzymology*, Vol. Volume 25 (Ed, C. H. W. Hirs, S. N. T.) *Academic Press*, pp. 424-438.
- Ha, S. W., Tonelli, A. E. and Hudson, S. M. (2005) Structural studies of *Bombyx mori* silk fibroin during regeneration from solutions and wet fiber spinning. *Biomacromolecules*, **6**, 1722-1731.
- Hagn, F., Eisoldt, L., Hardy, J. G., Vendrely, C., Coles, M., Scheibel, T. and Kessler, H. (2010) A conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly. *Nature*, **465**, 239-242.
- Hagn, F., Thamm, C., Scheibel, T. and Kessler, H. (2011) pH-dependent dimerization and salt-dependent stabilization of the N-terminal domain of spider dragline silk--implications for fiber formation. *Angew Chem Int Ed Engl*, **50**, 310-313.
- Haider, M., Leung, V., Ferrari, F., Crissman, J., Powell, J., Cappello, J. and Ghandehari, H. (2005) Molecular Engineering of Silk-Elastinlike Polymers for Matrix-Mediated Gene Delivery: Biosynthesis and Characterization. *Molecular Pharmaceutics*, **2**, 139-150.
- Hardy, J. G., Romer, L. M. and Scheibel, T. R. (2008) Polymeric materials based on silk proteins. *Polymer*, **49**, 4309-4327.
- Hayashi, C. Y. and Lewis, R. V. (1998) Evidence from flagelliform silk cDNA for the structural basis of elasticity and modular nature of spider silks. *Journal of Molecular Biology*, **275**, 773-784.
- Hayashi, C. Y. and Lewis, R. V. (2001) Spider flagelliform silk: lessons in protein design, gene structure, and molecular evolution. *Bioessays*, **23**, 750-756.
- Hayashi, C. Y., Shipley, N. H. and Lewis, R. V. (1999) Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins. *Int J Biol Macromol*, **24**, 271-275.
- Heim, M., Keerl, D. and Scheibel, T. (2009) Spider Silk: From Soluble Protein to Extraordinary Fiber. *Angewandte Chemie-International Edition*, **48**, 3584-3596.
- Heim, M., Romer, L. and Scheibel, T. (2010) Hierarchical structures made of proteins. The complex architecture of spider webs and their constituent silk proteins. *Chem Soc Rev*, **39**, 156-164.
- Heitz, J. R., Anderson, C. D. and Anderson, B. M. (1968) Inactivation of yeast alcohol dehydrogenase by N-alkylmaleimides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **127**, 627-636.

- Henze, R. and Urry, D. W. (1985) Dielectric relaxation studies demonstrate a peptide librational mode in the polypentapeptide of elastin. *Journal of the American Chemical Society*, **107**, 2991-2993.
- Hermanson, K. D., Harasim, M. B., Scheibel, T. and Bausch, A. R. (2007a) Permeability of silk microcapsules made by the interfacial adsorption of protein. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, **9**, 6442-6446.
- Hermanson, K. D., Huemmerich, D., Scheibel, T. and Bausch, A. R. (2007b) Engineered microcapsules fabricated from reconstituted spider silk. *Advanced Materials*, **19**, 1810-+.
- Hersel, U., Dahmen, C. and Kessler, H. (2003) RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, **24**, 4385-4415.
- Hijirida, D. H., Do, K. G., Michal, C., Wong, S., Zax, D. and Jelinski, L. W. (1996) ¹³C NMR of Nephila clavipes major ampullate silk gland. *Biophysical Journal*, **71**, 3442-3447.
- Hill, P., Brantley, H. and Van Dyke, M. (2010) Some properties of keratin biomaterials: kerateines. *Biomaterials*, **31**, 585-593.
- Hines, D. J. and Kaplan, D. L. (2011) Mechanisms of Controlled Release from Silk Fibroin Films. *Biomacromolecules*.
- Hinman, M. B. and Lewis, R. V. (1992) Isolation of a Clone Encoding a 2nd Dragline Silk Fibroin - Nephila-Clavipes Dragline Silk Is a 2-Protein Fiber. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 19320-19324.
- Hirota, N., Mizuno, K. and Goto, Y. (1997) Cooperative alpha-helix formation of beta-lactoglobulin and melittin induced by hexafluoroisopropanol. *Protein science : a publication of the Protein Society*, **6**, 416-421.
- Hofmann, S., Foo, C. T. W. P., Rossetti, F., Textor, M., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D. L., Merkle, H. P. and Meinel, L. (2006) Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release*, **111**, 219-227.
- Hofmeister, F. (1888) Zur Lehre von der Wirkung der Salze. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **25**, 1-30.
- Holland, G. P., Creager, M. S., Jenkins, J. E., Lewis, R. V. and Yarger, J. L. (2008a) Determining secondary structure in spider dragline silk by carbon-carbon correlation solid-state NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc*, **130**, 9871-9877.
- Holland, G. P., Jenkins, J. E., Creager, M. S., Lewis, R. V. and Yarger, J. L. (2008b) Solid-state NMR investigation of major and minor ampullate spider silk in the native and hydrated states. *Biomacromolecules*, **9**, 651-657.
- Holland, G. P., Lewis, R. V. and Yarger, J. L. (2004) WISE NMR characterization of nanoscale heterogeneity and mobility in supercontracted Nephila clavipes spider dragline silk. *Journal of the American Chemical Society*, **126**, 5867-5872.
- Hu, X., Kaplan, D. and Cebe, P. (2006) Determining beta-sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy. *Macromolecules*, **39**, 6161-6170.
- Hu, X., Kaplan, D. and Cebe, P. (2007) Effect of water on the thermal properties of silk fibroin. *Thermochimica Acta*, **461**, 137-144.
- Hu, X., Kaplan, D. and Cebe, P. (2008) Dynamic protein-water relationships during beta-sheet formation. *Macromolecules*, **41**, 3939-3948.
- Hu, X., Wang, X., Rnjak, J., Weiss, A. S. and Kaplan, D. L. (2010) Biomaterials derived from silk-tropoelastin protein systems. *Biomaterials*, **31**, 8121-8131.
- Huemmerich, D. (2004) Design, Synthese und Analyse von Spinnenseidenproteinen. In Institut für Organische Chemie und Biochemie, Vol. Dissertation *TU München*, München.
- Huemmerich, D., Helsen, C. W., Quedzuweit, S., Oschmann, J., Rudolph, R. and Scheibel, T. (2004a) Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility. *Biochemistry*, **43**, 13604-13612.
- Huemmerich, D., Scheibel, T., Vollrath, F., Cohen, S., Gat, U. and Ittah, S. (2004b) Novel assembly properties of recombinant spider dragline silk proteins. *Current biology : CB*, **14**, 2070-2074.

- Huemmerich, D., Slotta, U. and Scheibel, T. (2006) Processing and modification of films made from recombinant spider silk proteins. *Applied Physics A-Materials Science & Processing*, **82**, 219-222.
- Humenik, M., Scheibel, T. and Smith, A. (2011) Spider silk understanding the structure-function relationship of a natural fiber. *Prog Mol Biol Transl Sci*, **103**, 131-185.
- Hwang, J. H., Kim, I. G., Lee, J. Y., Piao, S., Lee, D. S., Lee, T. S., Ra, J. C. and Lee, J. Y. (2011) Therapeutic lymphangiogenesis using stem cell and VEGF-C hydrogel. *Biomaterials*, **32**, 4415-4423.
- Ikawa, T., Sajiki, H. and Hirota, K. (2005) Highly Chemoselective Hydrogenation Method Using Novel Finely Dispersed Palladium Catalyst on Silk-Fibroin: Its Preparation and Activity. *ChemInform*, **36**, no-no.
- Inoue, S., Tanaka, K., Arisaka, F., Kimura, S., Ohtomo, K. and Mizuno, S. (2000) Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio. *J Biol Chem*, **275**, 40517-40528.
- Ittah, S., Michaeli, A., Goldblum, A. and Gat, U. (2007) A model for the structure of the C-terminal domain of dragline spider silk and the role of its conserved cysteine. *Biomacromolecules*, **8**, 2768-2773.
- Janmey, P. A., Winer, J. P., Murray, M. E. and Wen, Q. (2009) The hard life of soft cells. *Cell motility and the cytoskeleton*, **66**, 597-605.
- Jelinski, L. W., Blye, A., Liivak, O., Michal, C., LaVerde, G., Seidel, A., Shah, N. and Yang, Z. (1999) Orientation, structure, wet-spinning, and molecular basis for supercontraction of spider dragline silk. *International Journal of Biological Macromolecules*, **24**, 197-201.
- Jenkins, J. E., Creager, M. S., Lewis, R. V., Holland, G. P. and Yarger, J. L. (2010) Quantitative Correlation between the Protein Primary Sequences and Secondary Structures in Spider Dragline Silks. *Biomacromolecules*, **11**, 192-200.
- Jeong, L., Yeo, I. S., Kim, H. N., Yoon, Y. I., Jang da, H., Jung, S. Y., Min, B. M. and Park, W. H. (2009) Plasma-treated silk fibroin nanofibers for skin regeneration. *International journal of biological macromolecules*, **44**, 222-228.
- Jiang, C. Y., Wang, X. Y., Gunawidjaja, R., Lin, Y. H., Gupta, M. K., Kaplan, D. L., Naik, R. R. and Tsukruk, V. V. (2007) Mechanical properties of robust ultrathin silk fibroin films. *Advanced Functional Materials*, **17**, 2229-2237.
- Jin, H. J. and Kaplan, D. L. (2003) Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature*, **424**, 1057-1061.
- Jin, H. J., Park, J., Karageorgiou, V., Kim, U. J., Valluzzi, R. and Kaplan, D. L. (2005) Water-stable silk films with reduced beta-sheet content. *Advanced Functional Materials*, **15**, 1241-1247.
- Jordan, S. W., Haller, C. A., Sallach, R. E., Apkarian, R. P., Hanson, S. R. and Chaikof, E. L. (2007) The effect of a recombinant elastin-mimetic coating of an ePTFE prosthesis on acute thrombogenicity in a baboon arteriovenous shunt. *Biomaterials*, **28**, 1191-1197.
- Junghans, F. M., M.; Conrad, U.; Scheibel, T.; Heilmann, A.; Spohn, U. (2006) Preparation and mechanical properties of layers made of recombinant spider silk proteins and silk from silk worm. *Applied Physics A*, **82**, 253-260
- Kantlehner, M., Schaffner, P., Finsinger, D., Meyer, J., Jonczyk, A., Diefenbach, B., Nies, B., Holzemann, G., Goodman, S. L. and Kessler, H. (2000) Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, **1**, 107-114.
- Karageorgiou, V., Meinel, L., Hofmann, S., Malhotra, A., Volloch, V. and Kaplan, D. (2004) Bone morphogenetic protein-2 decorated silk fibroin films induce osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **71A**, 528-537.
- Kasoju, N., Bhonde, R. R. and Bora, U. (2009) Preparation and characterization of *Antheraea assama* silk fibroin based novel non-woven scaffold for tissue engineering applications. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, **3**, 539-552.

- Keeley, F. W., Bellingham, C. M. and Woodhouse, K. A. (2002) Elastin as a self-organizing biomaterial: use of recombinantly expressed human elastin polypeptides as a model for investigations of structure and self-assembly of elastin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **357**, 185-189.
- Keerl, D., Hardy, J. G. and Scheibel, T. R. (2010) Biomimetic spinning of recombinant silk proteins. In *Micro- and Nanoscale Processing of Biomaterials*, Vol. 1239 (Eds, Narayan, R., Jayasinghe, S., Jin, S., Mullins, W. and Shi, D.) Warrendale, PA., pp. 20.
- Kempen, D. H. R., Lu, L., Hefferan, T. E., Creemers, L. B., Maran, A., Classic, K. L., Dhert, W. J. A. and Yaszemski, M. J. (2008) Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering. *Biomaterials*, **29**, 3245-3252.
- Keten, S. and Buehler, M. J. (2008a) Geometric confinement governs the rupture strength of H-bond assemblies at a critical length scale. *Nano Lett*, **8**, 743-748.
- Keten, S. and Buehler, M. J. (2008b) Strength limit of entropic elasticity in beta-sheet protein domains. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, **78**, 061913.
- Keten, S. and Buehler, M. J. (2010) Nanostructure and molecular mechanics of spider dragline silk protein assemblies. *J R Soc Interface*, **7**, 1709-1721.
- Keten, S., Xu, Z., Ihle, B. and Buehler, M. J. (2010) Nanoconfinement controls stiffness, strength and mechanical toughness of beta-sheet crystals in silk. *Nat Mater*, **9**, 359-367.
- Kim, D. H., Kim, Y. S., Amsden, J., Panilaitis, B., Kaplan, D. L., Omenetto, F. G., Zakin, M. R. and Rogers, J. A. (2009) Silicon electronics on silk as a path to bioresorbable, implantable devices. *Applied Physics Letters*, **95**, -.
- Kim, D. H., Viventi, J., Amsden, J. J., Xiao, J., Vigeland, L., Kim, Y. S., Blanco, J. A., Panilaitis, B., Frechette, E. S., Contreras, D., Kaplan, D. L., Omenetto, F. G., Huang, Y., Hwang, K. C., Zakin, M. R., Litt, B. and Rogers, J. A. (2010) Dissolvable films of silk fibroin for ultrathin conformal bio-integrated electronics. *Nat Mater*, **9**, 511-517.
- Kluge, J. A., Rabotyagova, O., Leisk, G. G. and Kaplan, D. L. (2008) Spider silks and their applications. *Trends Biotechnol*, **26**, 244-251.
- Knight, D. P., Knight, M. M. and Vollrath, F. (2000) Beta transition and stress-induced phase separation in the spinning of spider dragline silk. *International Journal of Biological Macromolecules*, **27**, 205-210.
- Knight, D. P. and Vollrath, F. (1999) Liquid crystals and flow elongation in a spider's silk production line. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **266**, 519-523.
- Knight, D. P. and Vollrath, F. (2001) Changes in element composition along the spinning duct in a *Nephila* spider. *Naturwissenschaften*, **88**, 179-182.
- Knight, D. P. and Vollrath, F. (2002) Biological liquid crystal elastomers. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **357**, 155-163.
- Kreplak, L., Doucet, J., Dumas, P. and Briki, F. (2004) New aspects of the alpha-helix to beta-sheet transition in stretched hard alpha-keratin fibers. *Biophys J*, **87**, 640-647.
- Kreplak, L., Herrmann, H. and Aebi, U. (2008) Tensile properties of single desmin intermediate filaments. *Biophys J*, **94**, 2790-2799.
- Krimm, S. and Bandekar, J. (1986) Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Advances in protein chemistry*, **38**, 181-364.
- Krishnaji, S. T., Huang, W., Rabotyagova, O., Kharlampieva, E., Choi, I., Tsukruk, V. V., Naik, R., Cebe, P. and Kaplan, D. L. (2011) Thin Film Assembly of Spider Silk-like Block Copolymers. *Langmuir*, **27**, 1000-1008.
- Kroll, D. J., Abdel-Malek Abdel-Hafiz, H., Marcell, T., Simpson, S., Chen, C. Y., Gutierrez-Hartmann, A., Lustbader, J. W. and Hoeffler, J. P. (1993) A multifunctional prokaryotic protein expression system: overproduction, affinity purification, and selective detection. *DNA and cell biology*, **12**, 441-453.
- Kummerlen, J., vanBeek, J. D., Vollrath, F. and Meier, B. H. (1996) Local structure in spider dragline silk investigated by two-dimensional spin-diffusion nuclear magnetic resonance. *Macromolecules*, **29**, 2920-2928.

- Kundu, S. C., Kundu, B., Talukdar, S., Bano, S., Nayak, S., Kundu, J., Mandal, B. B., Bhardwaj, N., Botlagunta, M., Dash, B. C., Acharya, C. and Ghosh, A. K. (2012) Non-mulberry Silk Biopolymers. *Biopolymers*, n/a-n/a.
- Kushner, A. M. and Guan, Z. (2011) Modular design in natural and biomimetic soft materials. *Angew Chem Int Ed Engl*, **50**, 9026-9057.
- Kweon, H. Y. and Park, Y. H. (1999) Structural and conformational changes of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin films treated with methanol solution. *Journal of Applied Polymer Science*, **73**, 2887-2894.
- Kwok, D. Y. and Neumann, A. W. (1999) Contact angle measurement and contact angle interpretation. *Advances in Colloid and Interface Science*, **81**, 167-249.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology*, **157**, 105-132.
- Lammel, A. (2010) Characterization, phase behavior and processing of silk proteins for controlled drug delivery. In Physik Department, Vol. PhD *Technische Universität München*, München.
- Lammel, A., Schwab, M., Hofer, M., Winter, G. and Scheibel, T. (2011) Recombinant spider silk particles as drug delivery vehicles. *Biomaterials*, **32**, 2233-2240.
- Lammel, A., Schwab, M., Slotta, U., Winter, G. and Scheibel, T. (2008) Processing conditions for the formation of spider silk microspheres. *ChemSusChem*, **1**, 413-416.
- Landreh, M., Askarieh, G., Nordling, K., Hedhammar, M., Rising, A., Casals, C., Astorga-Wells, J., Alvelius, G., Knight, S. D., Johansson, J., Jornvall, H. and Bergman, T. (2010) A pH-dependent dimer lock in spider silk protein. *J Mol Biol*, **404**, 328-336.
- Lao, U. L., Sun, M., Matsumoto, M., Mulchandani, A. and Chen, W. (2007) Genetic Engineering of Self-Assembled Protein Hydrogel Based on Elastin-like Sequences with Metal Binding Functionality. *Biomacromolecules*, **8**, 3736-3739.
- Lawrence, B. D., Cronin-Golomb, M., Georgakoudi, I., Kaplan, D. L. and Omenetto, F. G. (2008) Bioactive silk protein biomaterial systems for optical devices. *Biomacromolecules*, **9**, 1214-1220.
- Lawrence, B. D., Marchant, J. K., Pindrus, M. A., Omenetto, F. G. and Kaplan, D. L. (2009) Silk film biomaterials for cornea tissue engineering. *Biomaterials*, **30**, 1299-1308.
- Lawrence, B. D., Wharram, S., Kluge, J. A., Leisk, G. G., Omenetto, F. G., Rosenblatt, M. I. and Kaplan, D. L. (2010) Effect of Hydration on Silk Film Material Properties. *Macromol. Biosci.*, **10**, 393-403.
- Leal-Egana, A. and Scheibel, T. (2010) Silk-based materials for biomedical applications. *Biotechnol Appl Biochem*, **55**, 155-167.
- LeBaron, R. G. and Athanasiou, K. A. (2000) Extracellular matrix cell adhesion peptides: functional applications in orthopedic materials. *Tissue engineering*, **6**, 85-103.
- Lefevre, T., Boudreault, S., Cloutier, C. and Pezolet, M. (2008) Conformational and orientational transformation of silk proteins in the major ampullate gland of *Nephila clavipes* spiders. *Biomacromolecules*, **9**, 2399-2407.
- Lefevre, T., Leclerc, J., Rioux-Dube, J. F., Buffeteau, T., Paquin, M. C., Rousseau, M. E., Cloutier, I., Auger, M., Gagne, S. M., Boudreault, S., Cloutier, C. and Pezolet, M. (2007a) Conformation of spider silk proteins in situ in the intact major ampullate gland and in solution. *Biomacromolecules*, **8**, 2342-2344.
- Lefevre, T., Rousseau, M. E. and Pezolet, M. (2007b) Protein secondary structure and orientation in silk as revealed by Raman spectromicroscopy. *Biophys J*, **92**, 2885-2895.
- Li, B., Alonso, D. O. V. and Daggett, V. (2001) The molecular basis for the inverse temperature transition of elastin. *Journal of Molecular Biology*, **305**, 581-592.
- Li, M., Mondrinos, M. J., Chen, X., Gandhi, M. R., Ko, F. K. and Lelkes, P. I. (2006) Co-electrospun poly(lactide-co-glycolide), gelatin, and elastin blends for tissue engineering scaffolds. *Journal of biomedical materials research. Part A*, **79**, 963-973.
- Li, M., Mondrinos, M. J., Gandhi, M. R., Ko, F. K., Weiss, A. S. and Lelkes, P. I. (2005) Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials*, **26**, 5999-6008.

- Li, S. F., McGhie, A. J. and Tang, S. L. (1994) New internal structure of spider dragline silk revealed by atomic force microscopy. *Biophys J*, **66**, 1209-1212.
- Lieb, E., Hacker, M., Tessmar, J., Kunz-Schughart, L. A., Fiedler, J., Dahmen, C., Hersel, U., Kessler, H., Schulz, M. B. and Gopferich, A. (2005) Mediating specific cell adhesion to low-adhesive diblock copolymers by instant modification with cyclic RGD peptides. *Biomaterials*, **26**, 2333-2341.
- Liu, J., Zhang, X., Pang, H., Liu, B., Zou, Q. and Chen, J. (2012) High-performance bioanode based on the composite of CNTs-immobilized mediator and silk film-immobilized glucose oxidase for glucose/O₂ biofuel cells. *Biosensors & bioelectronics*, **31**, 170-175.
- Liu, T. L., Miao, J. C., Sheng, W. H., Xie, Y. F., Huang, Q., Shan, Y. B. and Yang, J. C. (2010) Cytocompatibility of regenerated silk fibroin film: a medical biomaterial applicable to wound healing. *Journal of Zhejiang University-Science B*, **11**, 10-16.
- Liu, T. X., Liu, Z. H., Ma, K. X., Shen, L., Zeng, K. Y. and He, C. B. (2003) Morphology, thermal and mechanical behavior of polyamide 6/layered-silicate nanocomposites. *Composites Science and Technology*, **63**, 331-337.
- Liu, Y., Shao, Z. and Vollrath, F. (2005) Relationships between supercontraction and mechanical properties of spider silk. *Nat Mater*, **4**, 901-905.
- Liu, Y., Sponner, A., Porter, D. and Vollrath, F. (2008) Proline and processing of spider silks. *Biomacromolecules*, **9**, 116-121.
- Lottspeich, F. and Zorbas, H. (1998) Bioanalytik, *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*, Heidelberg/Berlin.
- Lu, Q., Hu, X., Wang, X., Kluge, J.A., Lu, S., Cebe, P., Kaplan, D.L. (2009) Water-insoluble silk films with silk I structure. *Acta Biomater*, **6**, 1380-1387.
- Lu, S., Wang, X., Lu, Q., Hu, X., Uppal, N., Omenetto, F. G. and Kaplan, D. L. (2009) Stabilization of enzymes in silk films. *Biomacromolecules*, **10**, 1032-1042.
- Lv, Q., Hu, K., Feng, Q. L. and Cui, F. Z. (2008) Preparation of insoluble fibroin/collagen films without methanol treatment and the increase of its flexibility and cytocompatibility. *Journal of Applied Polymer Science*, **109**, 1577-1584.
- Madsen, B., Shao, Z. Z. and Vollrath, F. (1999) Variability in the mechanical properties of spider silks on three levels: interspecific, intraspecific and intraindividual. *International Journal of Biological Macromolecules*, **24**, 301-306.
- Magoshi, J., Magoshi, Y. and Nakamura, S. (1977) Physical-Properties and Structure of Silk .3. Glass-Transition and Conformational-Changes of Tussah Silk Fibroin. *Journal of Applied Polymer Science*, **21**, 2405-2407.
- Magoshi, J. and Nakamura, S. (1975) Studies on Physical-Properties and Structure of Silk - Glass-Transition and Crystallization of Silk Fibroin. *Journal of Applied Polymer Science*, **19**, 1013-1015.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *ColdSpring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.
- Matsen, M. W. and Bates, F. S. (1996) Unifying Weak- and Strong-Segregation Block Copolymer Theories. *Macromolecules*, **29**, 1091-1098.
- Megeed, Z., Haider, M., Li, D., O'Malley Jr, B. W., Cappello, J. and Ghandehari, H. (2004) In vitro and in vivo evaluation of recombinant silk-elastinlike hydrogels for cancer gene therapy. *Journal of Controlled Release*, **94**, 433-445.
- Metwalli, E., Slotta, U., Darko, C., Roth, S. V., Scheibel, T. and Papadakis, C. M. (2007) Structural changes of thin films from recombinant spider silk proteins upon post-treatment. *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, **89**, 655-661.
- Meyer, D. E., Shin, B. C., Kong, G. A., Dewhirst, M. W. and Chilkoti, A. (2001) Drug targeting using thermally responsive polymers and local hyperthermia. *Journal of Controlled Release*, **74**, 213-224.

- Mieszawska, A. J., Fournaligas, N., Georgakoudi, I., Ouhib, N. M., Belton, D. J., Perry, C. C. and Kaplan, D. L. (2010a) Osteoinductive silk-silica composite biomaterials for bone regeneration. *Biomaterials*, **31**, 8902-8910.
- Mieszawska, A. J., Nadkarni, L. D., Perry, C. C. and Kaplan, D. L. (2010b) Nanoscale control of silica particle formation via silk-silica fusion proteins for bone regeneration. *Chemistry of materials : a publication of the American Chemical Society*, **22**, 5780-5785.
- Min, B. M., Jeong, L., Nam, Y. S., Kim, J. M., Kim, J. Y. and Park, W. H. (2004) Formation of silk fibroin matrices with different texture and its cellular response to normal human keratinocytes. *Int J Biol Macromol*, **34**, 281-288.
- Minoura, N., Tsukada, M. and Nagura, M. (1990) Physicochemical Properties of Silk Fibroin Membrane as a Biomaterial. *Biomaterials*, **11**, 430-434.
- Mondia, J. P., Amsden, J. J., Lin, D., Negro, L. D., Kaplan, D. L. and Omenetto, F. G. (2010) Rapid nanoimprinting of doped silk films for enhanced fluorescent emission. *Advanced Materials*, **22**, 4596-4599.
- Morgan, A. W., Roskov, K. E., Lin-Gibson, S., Kaplan, D. L., Becker, M. L. and Simon, C. G. (2008) Characterization and optimization of RGD-containing silk blends to support osteoblastic differentiation. *Biomaterials*, **29**, 2556-2563.
- Morihara, Y., Ogata, S.-I., Kamitakahara, M., Ohtsuki, C. and Tanihara, M. (2005) Thermosensitive gel formation of novel polypeptides containing a collagen-derived Pro-Hyp-Gly sequence and an elastin-derived Val-Pro-Gly-Val-Gly sequence. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **43**, 6048-6056.
- Morisco, A., Accardo, A., Gianolio, E., Tesauero, D., Benedetti, E. and Morelli, G. (2009) Micelles derivatized with octreotide as potential target-selective contrast agents in MRI. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*, **15**, 242-250.
- Motriuk-Smith, D., Smith, A., Hayashi, C. Y. and Lewis, R. V. (2005) Analysis of the conserved N-terminal domains in major ampullate spider silk proteins. *Biomacromolecules*, **6**, 3152-3159.
- Motta, A., Fambri, L. and Migliaresi, C. (2002) Regenerated silk fibroin films: Thermal and dynamic mechanical analysis. *Macromolecular Chemistry and Physics*, **203**, 1658-1665.
- Murphy, A. R. and Kaplan, D. L. (2009) Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin. *J Mater Chem*, **19**, 6443-6450.
- Ninan, L., Monahan, J., Stroshine, R. L., Wilker, J. J. and Shi, R. (2003) Adhesive strength of marine mussel extracts on porcine skin. *Biomaterials*, **24**, 4091-4099.
- Numata, K. and Kaplan, D. L. (2010) Silk-based delivery systems of bioactive molecules. *Advanced drug delivery reviews*, **62**, 1497-1508.
- Numata, K., Mieszawska-Czajkowska, A. J., Kvenvold, L. A. and Kaplan, D. L. (2012) Silk-based nanocomplexes with tumor-homing peptides for tumor-specific gene delivery. *Macromolecular Bioscience*, **12**, 75-82.
- Numata, K., Reagan, M. R., Goldstein, R. H., Rosenblatt, M. and Kaplan, D. L. (2011) Spider silk-based gene carriers for tumor cell-specific delivery. *Bioconjugate chemistry*, **22**, 1605-1610.
- Numata, K., Subramanian, B., Currie, H. A. and Kaplan, D. L. (2009) Bioengineered silk protein-based gene delivery systems. *Biomaterials*, **30**, 5775-5784.
- O'Shea, E. K., Rutkowski, R. and Kim, P. S. (1992) Mechanism of specificity in the Fos-Jun oncoprotein heterodimer. *Cell*, **68**, 699-708.
- Pace, C. N. and Schmid, F. X. (1997) How to determine the molar absorbance coefficient of a protein. In Protein Structure: A Practical Approach.(Ed, Creighton, T. E.) IRL Press, Oxford, U.K., pp. 253-259.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein science : a publication of the Protein Society*, **4**, 2411-2423.
- Papadopoulos, P., Ene, R., Weidner, I. and Kremer, F. (2009a) Similarities in the Structural Organization of Major and Minor Ampullate Spider Silk. *Macromolecular Rapid Communications*, **30**, 851-857.

- Papadopoulos, P., Solter, J. and Kremer, F. (2007) Structure-property relationships in major ampullate spider silk as deduced from polarized FTIR spectroscopy. *Eur Phys J E Soft Matter*, **24**, 193-199.
- Papadopoulos, P., Solter, J. and Kremer, F. (2009b) Hierarchies in the structural organization of spider silk-a quantitative model. *Colloid and Polymer Science*, **287**, 231-236.
- Parker, S. T., Domachuk, P., Amsden, J., Bressner, J., Lewis, J. A., Kaplan, D. L. and Omenetto, F. G. (2009) Biocompatible Silk Printed Optical Waveguides. *Advanced Materials*, **21**, 2411-+.
- Parkhe, A. D., Seeley, S. K., Gardner, K., Thompson, L. and Lewis, R. V. (1997) Structural studies of spider silk proteins in the fiber. *J Mol Recognit*, **10**, 1-6.
- Partis, M. D., Griffiths, D. G., Roberts, G. C. and Beechey, R. B. (1983) Cross-linking of protein by ω -maleimido alkanoyl- α -hydroxysuccinimido esters. *Journal of Protein Chemistry*, **2**, 263-277.
- Perez-Rigueiro, J., Elices, M. and Guinea, G. V. (2003) Controlled supercontraction tailors the tensile behaviour of spider silk. *Polymer*, **44**, 3733-3736.
- Perez-Rigueiro, J., Elices, M., Plaza, G., Real, J. I. and Guinea, G. V. (2005) The effect of spinning forces on spider silk properties. *J Exp Biol*, **208**, 2633-2639.
- Pierschbacher, M. D. and Ruoslahti, E. (1984) Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, **309**, 30-33.
- Plazaola, A. and Candelas, G. C. (1991) Stimulation of fibroin synthesis elicits ultrastructural modifications in spider silk secretory cells. *Tissue Cell*, **23**, 277-284.
- Pritchard, E. M., Valentin, T., Boison, D. and Kaplan, D. L. (2011) Incorporation of proteinase inhibitors into silk-based delivery devices for enhanced control of degradation and drug release. *Biomaterials*, **32**, 909-918.
- Pruneda, E., Peralta-Hernández, J. M., Esquivel, K., Lee, S. Y., Godínez, L. A. and Mendoza, S. (2008) Water Vapor Permeability, Mechanical Properties and Antioxidant Effect of Mexican Oregano-Soy Based Edible Films. *Journal of food science*, **73**, C488-C493.
- Putthanarat, S., Eby, R. K., Naik, R. R., Juhl, S. B., Walker, M. A., Peterman, E., Ristich, S., Magoshi, J., Tanaka, T., Stone, M. O., Farmer, B. L., Brewer, C. and Ott, D. (2004) Nonlinear optical transmission of silk/green fluorescent protein (GFP) films. *Polymer*, **45**, 8451-8457.
- Qin, Z., Kreplak, L. and Buehler, M. J. (2009a) Hierarchical structure controls nanomechanical properties of vimentin intermediate filaments. *PLoS ONE*, **4**, e7294.
- Qin, Z., Kreplak, L. and Buehler, M. J. (2009b) Nanomechanical properties of vimentin intermediate filament dimers. *Nanotechnology*, **20**, 425101.
- Qiu, F., Chen, Y., Cheng, J., Wang, C., Xu, H. and Zhao, X. (2010) A Simple Method for Cell Sheet Fabrication Using Mica Surfaces Grafted with Peptide Detergent A6K. *Macromolecular Bioscience*, **10**, 881-886.
- Rabotyagova, O. S., Cebe, P. and Kaplan, D. L. (2010) Role of polyalanine domains in beta-sheet formation in spider silk block copolymers. *Macromol Biosci*, **10**, 49-59.
- Rabotyagova, O. S., Cebe, P. and Kaplan, D. L. (2011) Protein-based block copolymers. *Biomacromolecules*, **12**, 269-289.
- Radtke, C., Allmeling, C., Waldmann, K. H., Reimers, K., Thies, K., Schenk, H. C., Hillmer, A., Guggenheim, M., Brandes, G. and Vogt, P. M. (2011) Spider silk constructs enhance axonal regeneration and remyelination in long nerve defects in sheep. *PLoS ONE*, **6**, e16990.
- Rammensee, S., Slotta, U., Scheibel, T. and Bausch, A. R. (2008) Assembly mechanism of recombinant spider silk proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 6590-6595.
- Ramsden, J. (2008) Biomedical Surfaces (Engineering in Medicine & Biology), *Artech House Inc* London Boston.
- Rath, A., Davidson, A. R. and Deber, C. M. (2005) The structure of "unstructured" regions in peptides and proteins: role of the polyproline II helix in protein folding and recognition. *Biopolymers*, **80**, 179-185.
- Reches, M. and Gazit, E. (2003) Casting Metal Nanowires Within Discrete Self-Assembled Peptide Nanotubes. *Science*, **300**, 625-627.

- Reches, M. and Gazit, E. (2006) Controlled patterning of aligned self-assembled peptide nanotubes. *Nature nanotechnology*, **1**, 195-200.
- Reiersen, H., Clarke, A. R. and Rees, A. R. (1998) Short elastin-like peptides exhibit the same temperature-induced structural transitions as elastin polymers: implications for protein engineering. *J Mol Biol*, **283**, 255-264.
- Rief, M., Gautel, M., Oesterhelt, F., Fernandez, J. M. and Gaub, H. E. (1997) Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science*, **276**, 1109-1112.
- Riekel, C., Branden, C., Craig, C., Ferrero, C., Heidelbach, F. and Muller, M. (1999) Aspects of X-ray diffraction on single spider fibers. *Int J Biol Macromol*, **24**, 179-186.
- Riekel, C., Madsen, B., Knight, D. and Vollrath, F. (2000) X-ray diffraction on spider silk during controlled extrusion under a synchrotron radiation X-ray beam. *Biomacromolecules*, **1**, 622-626.
- Rising, A., Hjalme, G., Engstrom, W. and Johansson, J. (2006) N-terminal nonrepetitive domain common to dragline, flagelliform, and cylindriciform spider silk proteins. *Biomacromolecules*, **7**, 3120-3124.
- Rising, A., Widhe, M., Johansson, J. and Hedhammar, M. (2010) Spider silk proteins: recent advances in recombinant production, structure-function relationships and biomedical applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1-16.
- Rising, A., Widhe, M., Johansson, J. and Hedhammar, M. (2011) Spider silk proteins: recent advances in recombinant production, structure-function relationships and biomedical applications. *Cell Mol Life Sci*, **68**, 169-184.
- Rizos, A. K., Spandidos, D. A. and Krambovitis, E. (2003) Light scattering characterization of synthetic MUC-1 peptides and their behavior in dilute solution. *International journal of molecular medicine*, **12**, 559-563.
- Rohs, R., Etchebest, C. and Lavery, R. (1999) Unraveling proteins: a molecular mechanics study. *Biophys J*, **76**, 2760-2768.
- Rousseau, M. E., Hernandez Cruz, D., West, M. M., Hitchcock, A. P. and Pezolet, M. (2007) Nephila clavipes spider dragline silk microstructure studied by scanning transmission X-ray microscopy. *J Am Chem Soc*, **129**, 3897-3905.
- Ruoslahti, E. (1996) RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual review of cell and developmental biology*, **12**, 697-715.
- Sadick, N. and Sorhaindo, L. (2007) The utility of soft tissue fillers in clinical dermatology: treatment of fine wrinkles and skin defects. *Expert review of medical devices*, **4**, 559-565.
- Sajiki, H., Ikawa, T. and Hirota, K. (2003a) Markedly chemoselective hydrogenation with retention of benzyl ester and N-Cbz functions using a heterogeneous Pd-fibroin catalyst. *Tetrahedron Letters*, **44**, 8437-8439.
- Sajiki, H., Ikawa, T., Yamada, H., Tsubouchi, K. and Hirota, K. (2003b) Preparation of silk fibroin-supported Pd(0) catalyst for chemoselective hydrogenation: reduction of palladium(II) acetate by methanol on the protein. *Tetrahedron Letters*, **44**, 171-174.
- Sakai, S., Hirose, K., Taguchi, K., Ogushi, Y. and Kawakami, K. (2009) An injectable, in situ enzymatically gellable, gelatin derivative for drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, **30**, 3371-3377.
- Sambrook, J. and Russell, D. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual., Cold SpringHarbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.
- Sandberg, L. B., Leslie, J. G., Leach, C. T., Alvarez, V. L., Torres, A. R. and Smith, D. W. (1985) Elastin covalent structure as determined by solid phase amino acid sequencing. *Pathol Biol (Paris)*, **33**, 266-274.
- Sanford, K. and Kumar, M. (2005) New proteins in a materials world. *Curr Opin Biotechnol*, **16**, 416-421.
- Savage, K. N. and Gosline, J. M. (2008a) The effect of proline on the network structure of major ampullate silks as inferred from their mechanical and optical properties. *J Exp Biol*, **211**, 1937-1947.

- Savage, K. N. and Gosline, J. M. (2008b) The role of proline in the elastic mechanism of hydrated spider silks. *J Exp Biol*, **211**, 1948-1957.
- Schacht, K. and Scheibel, T. (2011) Controlled hydrogel formation of a recombinant spider silk protein. *Biomacromolecules*, **12**, 2488-2495.
- Scheibel, T., Parthasarathy, R., Sawicki, G., Lin, X. M., Jaeger, H. and Lindquist, S. L. (2003) Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 4527-4532.
- Scheller, J., Henggeler, D., Viviani, A. and Conrad, U. (2004) Purification of spider silk-elastin from transgenic plants and application for human chondrocyte proliferation. *Transgenic research*, **13**, 51-57.
- Schmid, F. X. (1997) Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. In Protein Structure: A Practical Approach.(Ed, Creighton, T. E.) IRL Press, Oxford, UK, pp. 261-297.
- Schmidt, S. and Friedl, P. (2010) Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell and tissue research*, **339**, 83-92.
- Schwabl, F. (2002) Quantenmechanik, Springer, Berlin.
- Shao, Z. and Vollrath, F. (2002) Surprising strength of silkworm silk. *Nature*, **418**, 741.
- Shao, Z., Vollrath, F., Sirichaisit, J. and Young, R. J. (1999) Analysis of spider silk in native and supercontracted states using Raman spectroscopy. *Polymer*, **40**, 2493-2500.
- Sheila, M. (2008) Biomaterials for tissue engineering of skin. *Materials Today*, **11**, 26-35.
- Sheu, M.-T., Huang, J.-C., Yeh, G.-C. and Ho, H.-O. (2001) Characterization of collagen gel solutions and collagen matrices for cell culture. *Biomaterials*, **22**, 1713-1719.
- Sheu, S. Y., Yang, D. Y., Selzle, H. L. and Schlag, E. W. (2003) Energetics of hydrogen bonds in peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12683-12687.
- Shin, H., Jo, S. and Mikos, A. G. (2003) Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*, **24**, 4353-4364.
- Sierpinski, P., Garrett, J., Ma, J., Apel, P., Klorig, D., Smith, T., Koman, L. A., Atala, A. and Van Dyke, M. (2008) The use of keratin biomaterials derived from human hair for the promotion of rapid regeneration of peripheral nerves. *Biomaterials*, **29**, 118-128.
- Simmons, A., Ray, E. and Jelinski, L. W. (1994) Solid-State ¹³C NMR of Nephila clavipes Dragline Silk Establishes Structure and Identity of Crystalline Regions. *Macromolecules*, **27**, 5235-5237.
- Simmons, A. H., Michal, C. A. and Jelinski, L. W. (1996) Molecular orientation and two-component nature of the crystalline fraction of spider dragline silk. *Science*, **271**, 84-87.
- Sinsawat, A., Putthananarat, S., Magoshi, Y., Pachter, R. and Eby, R. K. (2002) X-ray diffraction and computational studies of the modulus of silk (Bombyx mori). *Polymer*, **43**, 1323-1330.
- Slotta, U., Hess, S., Spiess, K., Stromer, T., Serpell, L. and Scheibel, T. (2007) Spider silk and amyloid fibrils: a structural comparison. *Macromol Biosci*, **7**, 183-188.
- Slotta, U., Tammer, M., Kremer, F., Koelsch, P. and Scheibel, T. (2006) Structural analysis of spider silk films. *Supramolecular Chemistry*, **18**, 465-471.
- Slotta, U. K., Rammensee, S., Gorb, S. and Scheibel, T. (2008) An Engineered Spider Silk Protein Forms Microspheres. *Angew Chem Int Ed Engl*, **47**, 4592-4594.
- Smith, A. M., Scheibel, T. (2010) Functional Amyloids Used by Organisms: A Lesson in Controlling Assembly. *Macromol. Chem. Phys.*, **211**, 127-135.
- Smith, J. F., Knowles, T. P., Dobson, C. M., Macphree, C. E. and Welland, M. E. (2006) Characterization of the nanoscale properties of individual amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 15806-15811.
- Sofia, S., McCarthy, M. B., Gronowicz, G. and Kaplan, D. L. (2001) Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *Journal of Biomedical Materials Research*, **54**, 139-148.

- Spiess, K., Ene, R., Keenan, C. D., Senker, J., Kremer, F. and Scheibel, T. (2011) Impact of initial solvent on thermal stability and mechanical properties of recombinant spider silk films. *Journal of Materials Chemistry*, **21**, 13594-13604.
- Spiess, K., Lammel, A. and Scheibel, T. (2010a) Recombinant spider silk proteins for applications in biomaterials. *Macromol Biosci*, **10**, 998-1007.
- Spiess, K., Wohlrab, S. and Scheibel, T. (2010b) Structural characterization and functionalization of engineered spider silk films. *Soft Matter*, **6**, 4168-4174.
- Sponner, A., Vater, W., Monajembashi, S., Unger, E., Grosse, F. and Weisshart, K. (2007) Composition and hierarchical organisation of a spider silk. *PLoS ONE*, **2**, e998.
- Srinivasan, B., Kumar, R., Shanmugam, K., Sivagnam, U. T., Reddy, N. P. and Sehgal, P. K. (2010) Porous keratin scaffold—promising biomaterial for tissue engineering and drug delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **92B**, 5-12.
- Strelkov, S. V., Herrmann, H. and Aebi, U. (2003) Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays*, **25**, 243-251.
- Sugihara, A., Sugiura, K., Morita, H., Ninagawa, T., Tubouchi, K., Tobe, R., Izumiya, M., Horio, T., Abraham, N. G. and Ikehara, S. (2000) Promotive effects of a silk film on epidermal recovery from full-thickness skin wounds. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **225**, 58-64.
- Szela, S., Avtges, P., Valluzzi, R., Winkler, S., Wilson, D., Kirschner, D. and Kaplan, D. L. (2000) Reduction-oxidation control of beta-sheet assembly in genetically engineered silk. *Biomacromolecules*, **1**, 534-542.
- Szybala, C., Pritchard, E. M., Lusardi, T. A., Li, T., Wilz, A., Kaplan, D. L. and Boison, D. (2009) Antiepileptic effects of silk-polymer based adenosine release in kindled rats. *Experimental neurology*, **219**, 126-135.
- Takasu, Y., Yamada, H. and Tsubouchi, K. (2002) Isolation of three main sericin components from the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **66**, 2715-2718.
- Tamm, L. K. and Tatulian, S. A. (1997) Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. *Quarterly reviews of biophysics*, **30**, 365-429.
- Tao, H., Amsden, J. J., Strikwerda, A. C., Fan, K., Kaplan, D. L., Zhang, X., Averitt, R. D. and Omenetto, F. G. (2010) Metamaterial silk composites at terahertz frequencies. *Adv Mater*, **22**, 3527-3531.
- Tao, H., Brenckle, M. A., Yang, M., Zhang, J., Liu, M., Siebert, S. M., Averitt, R. D., Mannoer, M. S., McAlpine, M. C., Rogers, J. A., Kaplan, D. L. and Omenetto, F. G. (2012) Silk-Based Conformal, Adhesive, Edible Food Sensors. *Advanced Materials*.
- Tao, H., Chieffo, L. R., Brenckle, M. A., Siebert, S. M., Liu, M., Strikwerda, A. C., Fan, K., Kaplan, D. L., Zhang, X., Averitt, R. D. and Omenetto, F. G. (2011) Metamaterials on paper as a sensing platform. *Advanced Materials*, **23**, 3197-3201.
- Termonia, Y. (1994) Molecular Modeling of Spider Silk Elasticity. *Macromolecules*, **27**, 7378-7381.
- Teßmar, J., Holland, T. and Mikos, A. G. (2005) Scaffolding in Tissue Engineering In Laboratory-scale manufacture of cell carriers (Ed, Ma, P. X.) *CRC*.
- Teulé, F., Addison, B., Cooper, A. R., Ayon, J., Henning, R. W., Benmore, C. J., Holland, G. P., Yarger, J. L. and Lewis, R. V. (2011) Combining flagelliform and dragline spider silk motifs to produce tunable synthetic biopolymer fibers. *Biopolymers*, n/a-n/a.
- Teule, F., Cooper, A. R., Furin, W. A., Bittencourt, D., Rech, E. L., Brooks, A. and Lewis, R. V. (2009) A protocol for the production of recombinant spider silk-like proteins for artificial fiber spinning. *Nature Protocols*, **4**, 341-355.
- Tian, Z., Li, H., Wang, M., Zhang, A. and Feng, Z.-G. (2008) Vesicular and tubular structures prepared from self-assembly of novel amphiphilic ABA triblock copolymers in aqueous solutions. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **46**, 1042-1050.
- Tretinnikov, O. N. and Tamada, Y. (2001) Influence of casting temperature on the near-surface structure and wettability of cast silk fibroin films. *Langmuir*, **17**, 7406-7413.

- Tsukada, M., Gotoh, Y., Nagura, M., Minoura, N., Kasai, N. and Freddi, G. (1994) Structural-Changes of Silk Fibroin Membranes Induced by Immersion in Methanol Aqueous-Solutions. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, **32**, 961-968.
- Uebersax, L., Fedele, D. E., Schumacher, C., Kaplan, D. L., Merkle, H. P., Boison, D. and Meinel, L. (2006) The support of adenosine release from adenosine kinase deficient ES cells by silk substrates. *Biomaterials*, **27**, 4599-4607.
- Uebersax, L., Merkle, H. P. and Meinel, L. (2008) Insulin-like growth factor I releasing silk fibroin scaffolds induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, **127**, 12-21.
- Um, I. C., Kweon, H. Y., Lee, K. G. and Park, Y. H. (2003) The role of formic acid in solution stability and crystallization of silk protein polymer. *International journal of biological macromolecules*, **33**, 203-213.
- Um, I. C., Kweon, H. Y., Park, Y. H. and Hudson, S. (2001) Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid. *Int J Biol Macromol*, **29**, 91-97.
- Urry, D. W., Hugel, T., Seitz, M., Gaub, H. E., Sheiba, L., Dea, J., Xu, J. and Parker, T. (2002) Elastin: a representative ideal protein elastomer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **357**, 169-184.
- Urry, D. W., Mitchell, L. W., Ohnishi, T. and Long, M. M. (1975) Proton and carbon magnetic resonance studies of the synthetic polypentapeptide of elastin. *Journal of molecular biology*, **96**, 101-117.
- Urry, D. W. and Parker, T. M. (2002) Mechanics of elastin: molecular mechanism of biological elasticity and its relationship to contraction. *Journal of muscle research and cell motility*, **23**, 543-559.
- Urry, D. W., Shaw, R. G. and Prasad, K. U. (1985) Polypentapeptide of elastin: temperature dependence of ellipticity and correlation with elastomeric force. *Biochemical and biophysical research communications*, **130**, 50-57.
- van Beek, J. D., Hess, S., Vollrath, F. and Meier, B. H. (2002) The molecular structure of spider dragline silk: folding and orientation of the protein backbone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 10266-10271.
- van Hest, J. C. and Tirrell, D. A. (2001) Protein-based materials, toward a new level of structural control. *Chem Commun (Camb)*, 1897-1904.
- Vasconcelos, A., Freddi, G. and Cavaco-Paulo, A. (2008) Biodegradable materials based on silk fibroin and keratin. *Biomacromolecules*, **9**, 1299-1305.
- Vauthey, S., Santoso, S., Gong, H., Watson, N. and Zhang, S. (2002) Molecular self-assembly of surfactant-like peptides to form nanotubes and nanovesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 5355-5360.
- Velzenberger, E., El Kirat, K., Legeay, G., Nagel, M. D. and Pezron, I. (2009) Characterization of biomaterials polar interactions in physiological conditions using liquid-liquid contact angle measurements Relation to fibronectin adsorption. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, **68**, 238-244.
- Vendrely, C. and Scheibel, T. (2007) Biotechnological production of spider-silk proteins enables new applications. *Macromolecular Bioscience*, **7**, 401-409.
- Venkatachalam, C. M. and Urry, D. W. (1981) Development of a linear helical conformation from its cyclic correlate. β -Spiral model of the elastin poly(pentapeptide) (VPGVG)_n. *Macromolecules*, **14**, 1225-1229.
- Vepari, C., D.Matheson, L. Drummy, R. Naik, D. L. Kaplan (2009) Surface modification of silk fibroin with poly(ethylene glycol) for antiadhesion and antithrombotic applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **93 A**, 595.
- Vepari, C., Kaplan, D.L. (2007) Silk as a biomaterial. *Progress in Polymer Science*, **32**, 991-1007.
- Versluis, F., Marsden, H. R. and Kros, A. (2010) Power struggles in peptide-amphiphile nanostructures. *Chem Soc Rev*, **39**, 3434-3444.
- Vollrath, F. (2000) Strength and structure of spiders' silks. *J Biotechnol*, **74**, 67-83.

- Vollrath, F. and Knight, D. P. (2001) Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature*, **410**, 541-548.
- Vollrath, F. and Porter, D. (2006) Spider silk as archetypal protein elastomer. *Soft Matter*, **2**, 377-385.
- Vrhovski, B. and Weiss, A. S. (1998) Biochemistry of tropoelastin. *European Journal of Biochemistry*, **258**, 1-18.
- Wang, X., Hu, X., Daley, A., Rabotyagova, O., Cebe, P. and Kaplan, D. L. (2007a) Nanolayer biomaterial coatings of silk fibroin for controlled release. *J Control Release*, **121**, 190-199.
- Wang, X., Wenk, E., Hu, X., Castro, G. R., Meinel, L., Wang, X., Li, C., Merkle, H. and Kaplan, D. L. (2007b) Silk coatings on PLGA and alginate microspheres for protein delivery. *Biomaterials*, **28**, 4161-4169.
- Wang, Y. Z., Kim, H. J., Vunjak-Novakovic, G. and Kaplan, D. L. (2006) Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials*, **27**, 6064-6082.
- Weis-Fogh, T. and Anderson, S. O. (1970) New molecular model for the long-range elasticity of elastin. *Nature*, **227**, 718-721.
- Wen, H. X., Lan, X. Q., Zhang, Y. S., Zhao, T. F., Wang, Y. J., Kajiura, Z. and Nakagaki, M. (2010) Transgenic silkworms (*Bombyx mori*) produce recombinant spider dragline silk in cocoons. *Molecular Biology Reports*, **37**, 1815-1821.
- Wenk, E., Meinel, A. J., Wildy, S., Merkle, H. P. and Meinel, L. (2009) Microporous silk fibroin scaffolds embedding PLGA microparticles for controlled growth factor delivery in tissue engineering. *Biomaterials*, **30**, 2571-2581.
- Wenk, E., Murphy, A. R., Kaplan, D. L., Meinel, L., Merkle, H. P. and Uebersax, L. (2010) The use of sulfonated silk fibroin derivatives to control binding, delivery and potency of FGF-2 in tissue regeneration. *Biomaterials*, **31**, 1403-1413.
- Wenzel, R. N. (1948) Surface Roughness and Contact Angle. *The Journal of Physical and Colloid Chemistry*, **53**, 1466-1467.
- Widhe, M., Bysell, H., Nystedt, S., Schenning, I., Malmsten, M., Johansson, J., Rising, A. and Hedhammar, M. (2010) Recombinant spider silk as matrices for cell culture. *Biomaterials*, **31**, 9575-9585.
- Widhe, M., Johansson, J., Hedhammar, M. and Rising, A. (2011) Current progress and limitations of spider silk for biomedical applications. *Biopolymers*.
- Willcox, P. J., Gido, S. P., Muller, W. and Kaplan, D. L. (1996) Evidence of a cholesteric liquid crystalline phase in natural silk spinning processes. *Macromolecules*, **29**, 5106-5110.
- Wilz, A., Pritchard, E. M., Li, T., Lan, J. Q., Kaplan, D. L. and Boison, D. (2008) Silk polymer-based adenosine release: therapeutic potential for epilepsy. *Biomaterials*, **29**, 3609-3616.
- Winkler, S., Szela, S., Avtges, P., Valluzzi, R., Kirschner, D. A. and Kaplan, D. (1999) Designing recombinant spider silk proteins to control assembly. *International journal of biological macromolecules*, **24**, 265-270.
- Winkler, S., Wilson, D. and Kaplan, D. L. (2000) Controlling beta-sheet assembly in genetically engineered silk by enzymatic Phosphorylation/Dephosphorylation, by. *Biochemistry*, **39**, 14002.
- Wohlrab, S. (2010) Modifikation, Prozessierung und Charakterisierung des rekombinanten Spinnenseidenproteins eADF4(C16). In Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften, Vol. Diplomarbeit Universität Bayreuth, Bayreuth.
- Woodhouse, K. A., Klement, P., Chen, V., Gorbet, M. B., Keeley, F. W., Stahl, R., Fromstein, J. D. and Bellingham, C. M. (2004) Investigation of recombinant human elastin polypeptides as non-thrombogenic coatings. *Biomaterials*, **25**, 4543-4553.
- Wright, E. R. and Conticello, V. P. (2002) Self-assembly of block copolymers derived from elastin-mimetic polypeptide sequences. *Adv Drug Deliv Rev*, **54**, 1057-1073.
- Xia, X.-X., Qian, Z.-G., Ki, C. S., Park, Y. H., Kaplan, D. L. and Lee, S. Y. (2010) Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 14059-14063.

- Xiang, P., Li, M., Zhang, C. Y., Chen, D. L. and Zhou, Z. H. (2011) Cytocompatibility of electrospun nano fiber tubular scaffolds for small diameter tissue engineering blood vessels. *International journal of biological macromolecules*, **49**, 281-288.
- Xiao, S. B., Stacklies, W., Cetinkaya, M., Markert, B. and Grater, F. (2009) Mechanical Response of Silk Crystalline Units from Force-Distribution Analysis. *Biophysical Journal*, **96**, 3997-4005.
- Xu, Z. and Buehler, M. J. (2010) Mechanical energy transfer and dissipation in fibrous beta-sheet-rich proteins. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, **81**, 061910.
- Yanagisawa, S., Zhu, Z. H., Kobayashi, I., Uchino, K., Tamada, Y., Tamura, T. and Asakura, T. (2007) Improving cell-adhesive properties of recombinant Bombyx mori silk by incorporation of collagen or fibronectin derived peptides produced by transgenic silkworms. *Biomacromolecules*, **8**, 3487-3492.
- Yeh, H., Ornstein-Goldstein, N., Indik, Z., Sheppard, P., Anderson, N., Rosenbloom, J. C., Cicila, G., Yoon, K. and Rosenbloom, J. (1987) Sequence variation of bovine elastin mRNA due to alternative splicing. *Coll Relat Res*, **7**, 235-247.
- Yemini, M., Reches, M., Rishpon, J. and Gazit, E. (2004) Novel Electrochemical Biosensing Platform Using Self-Assembled Peptide Nanotubes. *Nano Letters*, **5**, 183-186.
- Yeung, T., Georges, P. C., Flanagan, L. A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V. and Janmey, P. A. (2005) Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motil Cytoskeleton*, **60**, 24-34.
- Young, S., Wong, M., Tabata, Y. and Mikos, A. G. (2005) Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *Journal of Controlled Release*, **109**, 256-274.
- Yucel, T., Cebe, P. and Kaplan, D. L. (2011) Structural Origins of Silk Piezoelectricity. *Advanced Functional Materials*, **21**, 779-785.
- Zelzer, M. and Ulijn, R. V. (2010) Next-generation peptide nanomaterials: molecular networks, interfaces and supramolecular functionality. *Chem Soc Rev*, **39**, 3351-3357.
- Zhang, K., Mo, X., Huang, C., He, C. and Wang, H. (2010) Electrospun scaffolds from silk fibroin and their cellular compatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **93A**, 976-983.
- Zhang, Y. and Cremer, P. S. (2006) Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series. *Current opinion in chemical biology*, **10**, 658-663.
- Zhao, C., Yao, J., Masuda, H., Kishore, R. and Asakura, T. (2003) Structural characterization and artificial fiber formation of Bombyx mori silk fibroin in hexafluoro-iso-propanol solvent system. *Biopolymers*, **69**, 253-259.
- Zhu, H., Wu, B., Feng, X. and Chen, J. (2011) Preparation and characterization of bioactive mesoporous calcium silicate-silk fibroin composite films. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, **98B**, 330-341.
- Zhu, H. L., Feng, X. X., Zhang, H. P., Guo, Y. H., Zhang, J. Z. and Chen, J. Y. (2009) Structural Characteristics and Properties of Silk Fibroin/Poly(lactic acid) Blend Films. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, **20**, 1259-1274.
- Zimm, B. H. (1948a) Apparatus and Methods for Measurement and Interpretation of the Angular Variation of Light Scattering; Preliminary Results on Polystyrene Solutions. *J. Chem. Phys.*, **16**, 1099-1116.
- Zimm, B. H. (1948b) The Scattering of Light and the Radial Distribution Function of High Polymer Solutions. *The Journal of Chemical Physics*, **16**, 1093-1099.
- Zinger, O., Anselme, K., Denzer, A., Habersetzer, P., Wieland, M., Jeanfils, J., Hardouin, P. and Landolt, D. (2004) Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. *Biomaterials*, **25**, 2695-2711.
- Zorlutuna, P., Elsheikh, A. and Hasirci, V. (2009) Nanopatterning of collagen scaffolds improve the mechanical properties of tissue engineered vascular grafts. *Biomacromolecules*, **10**, 814-821.

8 Abkürzungen

<i>A. diadematus</i>	<i>Araneus diadematus</i> (Europäische Gartenkreuzspinne)
a.u.	<i>Arbitrary units</i> (willkürliche Einheiten)
ADF	<i>Araneus diadematus</i> Fibroin
AFM	<i>Atomic force microscopy</i> (Rasterkraftmikroskopie)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Ameisensäure
ATR	<i>Attenuated total reflection</i>
<i>B. mori</i>	<i>Bombyx mori</i> (Maulbeerspinner)
BCIP/NBT	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat/Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
CD	Circulardichroismus
Cys-Varianten, Cys-Protein	Cystein-beinhaltende Mutanten des Proteins eADF4(C16)
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMA	Dynamisch Mechanische Analyse
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dn/dc	Brechungsindexinkrement
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie, <i>differential scanning calorimetry</i>
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure), Ellmans Reagens
DTTox	trans-4,5-Dihydroxy-1,2-dithian
DTTred	1,4-Dithiotreitol
E'	Speichermodul
E''	Verlustmodul
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eADF4(C16)	<i>engineered</i> ADF4, welches 16 sog. C-Module umfasst
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
E-Modul	Young's Modul/Elastizitätsmodul
EtOH (abs.)	Ethanol (absolut)
FKS	fötales Kälberserum
FSD	Fourier Selbstdekonvolution
FTIR	Fouriertransformiertes Infrarot
GdmHCl	Guanidiniumhydrochlorid
GdmSCN	Guanidiniumthiocyanat
H ₂ O _{MQ}	Reinstwasser
H-Brücke	Wasserstoffbrücke
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-hansulfonsäure
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
Kan	Kanamycin
MaSp	<i>major ampullate</i> Spidroine (gebildet in der großen Ampullendrüse)
MD	<i>Molecular dynamics</i>
MeOH (abs.)	Methanol (absolut)
Modul C	Konsensussequenz, abgeleitet von ADF4
Modul C*	Modul C, bei dem Serin (Position 25) gegen Cystein substituiert wurde

MWCO	molecular weight cut-off (molekulares Ausschlussgewicht)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanzspektroskopie)
NR _N , NR _C	nicht-repetitive Domäne, amino (N) -bzw. Carboxy (c)-terminal
<i>ntag</i> ^{Cys}	aminoterminal Aminosäuresequenz (GCGGSGGGSGGGG)
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
p.a.	pro analysis
PEG	Polyethylenglycol
Pos.K.	Positivkontrolle
PTFE	Polytetrafluorethylen
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RF	relative Feuchte
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat (Zelladhäsionssequenz)
R _g	Trägheitsradius, Gyrationradius
R _h	Hydrodynamischer Radius
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SF	Seidenfibroin (aus <i>B. mori</i>)
S ^{mol}	Ordnungsparameter der Ausrichtung von Molekülschwinungen
ssNMR	<i>solid state nuclear magnetic resonance</i>
tan δ	Verlustfaktor
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoro acetic acid (Trifluoressigsäure)
T _g	Glasübergangstemperatur
TGA	Thermogravimetrische Analyse
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxoethylensorbitan-monolaureat
ÜN	über Nacht
unb.	unbehandelt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wL	wässrige (Puffer-)Lösung
WST-1	<i>water soluble tetranonium-1</i>
β-Polyalanin	Polyalanin-Cluster mit β-Faltblatt-Konformation
ε	Dehnung
ε _λ	molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ
λ	Wellenlänge
μl	Mikroliter
ν̃	Wellenzahl
σ	Spannung
σ _{max}	Dehnbarkeit, maximale Dehnung, Bruchdehnung
θ	Milligrad (mdeg)

9 Publikationen

Wohlrab, S.*, Spiess, K.* and Scheibel, T. (2012) Changing surface hydrophobicities using spider silk films. in Vorbereitung

Spiess, K., Ene, R., Keenan, C. D., Senker, J., Kremer, F. and Scheibel, T. (2011) Impact of initial solvent on thermal stability and mechanical properties of recombinant spider silk films. *Journal of Materials Chemistry*, **21**, 13594-13604.

Spiess, K., Wohlrab, S. and Scheibel, T. (2010) Structural characterization and functionalization of engineered spider silk films. *Soft Matter*, **6**, 4168-4174.

Spiess, K.*, Lammel, A.* and Scheibel, T. (2010) Recombinant spider silk proteins for applications in biomaterials. *Macromol Biosci*, **10**, 998-1007.

Slota, U., Hess, S., Spiess, K., Stromer, T., Serpell, L. and Scheibel, T. (2007) Spider silk and amyloid fibrils: a structural comparison. *Macromol Biosci*, **7**, 183-188.

Buchkapitel:

Slota, U.*, Spiess, K.* and Scheibel, T. (2012) Spider silk. In: *The Functional Fold. Useful Amyloid Structures in Nature*, S. P. Jarvis & A. S. Mostaert (eds). Pan Stanford Publishing Pte. Ptd., ISBN 978-981-4267-40-3 (Hardcover), 978-981-4267-62-5 (eBook)

Andere:

Spiess, K., Römer, L.M. & Scheibel, T. Transparente Folien aus Spinnenseide – Ein Hocheistungsmaterial aus der Natur in neuem Gewand. *GIT Labor-Fachzeitschrift*, 11/2007, pp. 928-931

Lammel, A., Spieß, K., Blüm, C., Schwab, M., Winter, G. and Scheibel, T. (2009) Spinnenseidenproteine – Biopolymerische Materialien für medizintechnische Anwendungen. In *Verbundwerkstoffe*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 683-688.

* gleichberechtigte Co-Autorenschaft

10 Anhang

10.1 Spannung bei schrittweiser Dehnung von eADF4(C16)-Filmen

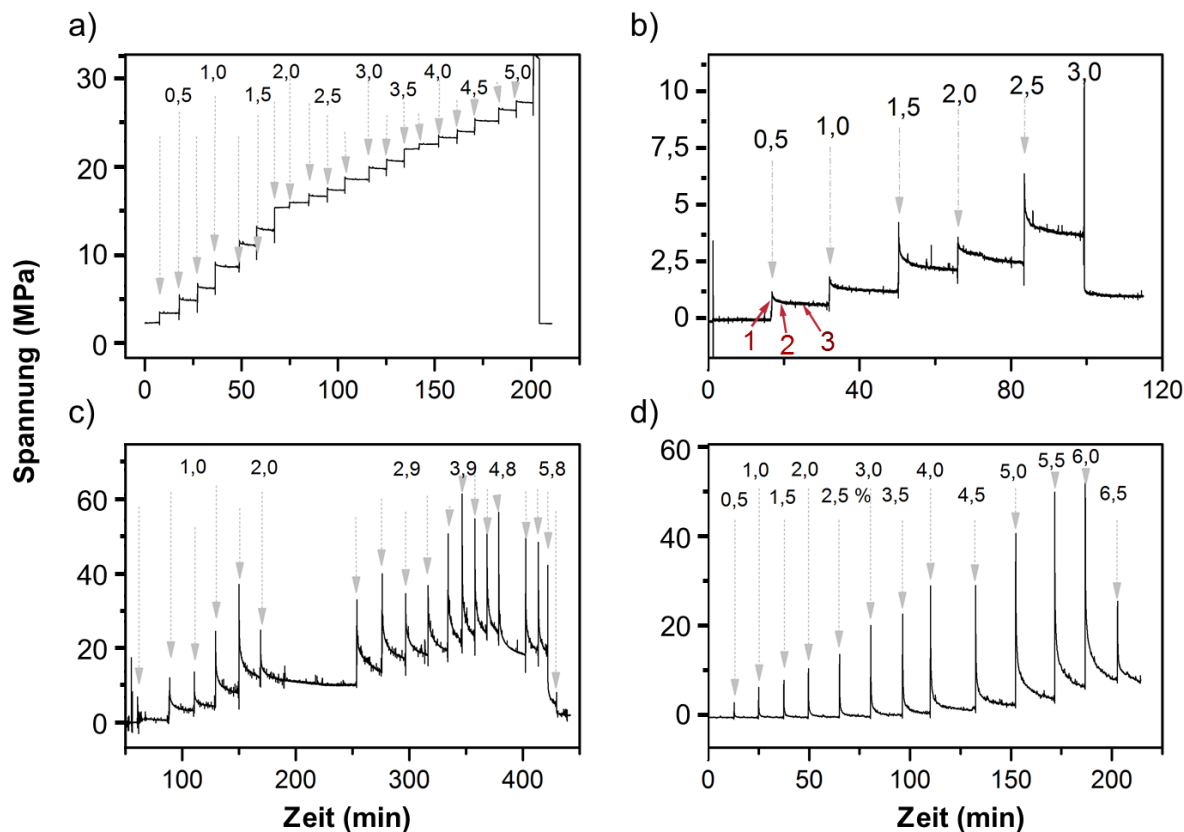


Abb. 10.1: Auftretende Spannung bei schrittweiser Dehnung von eADF4(C16)-Filmen im zeitlichen Verlauf. Die jeweils aufgebrachte Dehnung (in %) ist ebenfalls angegeben. Das Experiment wurde wie in Abb. 3.12 beschrieben durchgeführt: Die Probe wurde mittels Mikrometerschraube um eine definierte Länge gedehnt, was zu einem steilen Signal im Kraftsensor führt (1). Nach anschließender Relaxation der Probe (2) wurden polarisierte FTIR-Messungen durchgeführt (3). Die Spannung entspricht der gemessenen Kraft pro Querschnittsfläche des Filmes, welche für jeden Film individuell bestimmt wurde. (a) HFIP-Film ohne Nachbehandlung, (b) HFIP-Film nachbehandelt mit Methanol abs., (c) Film aus wässriger Lösung ohne Nachbehandlung, (d) Film aus wässriger Lösung nachbehandelt mit Methanol abs.

10.2 REM Aufnahmen der Filmoberfläche

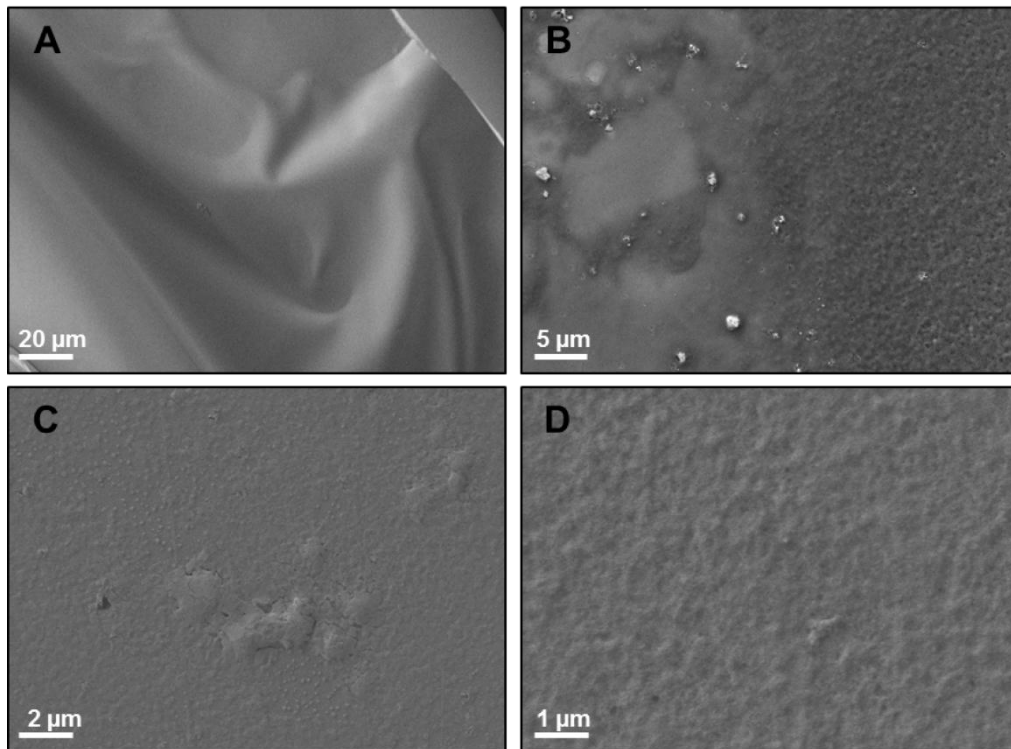


Abb. 10.2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von aus HFIP gegossenen eADF4(C16)-Filmen (A) ohne Nachbehandlung, (B) mit 70 % Methanol nachbehandelt, (C) mit 70 % Ethanol nachbehandelt (D) mit 1 M Kaliumphosphat-Lösung nachbehandelt.

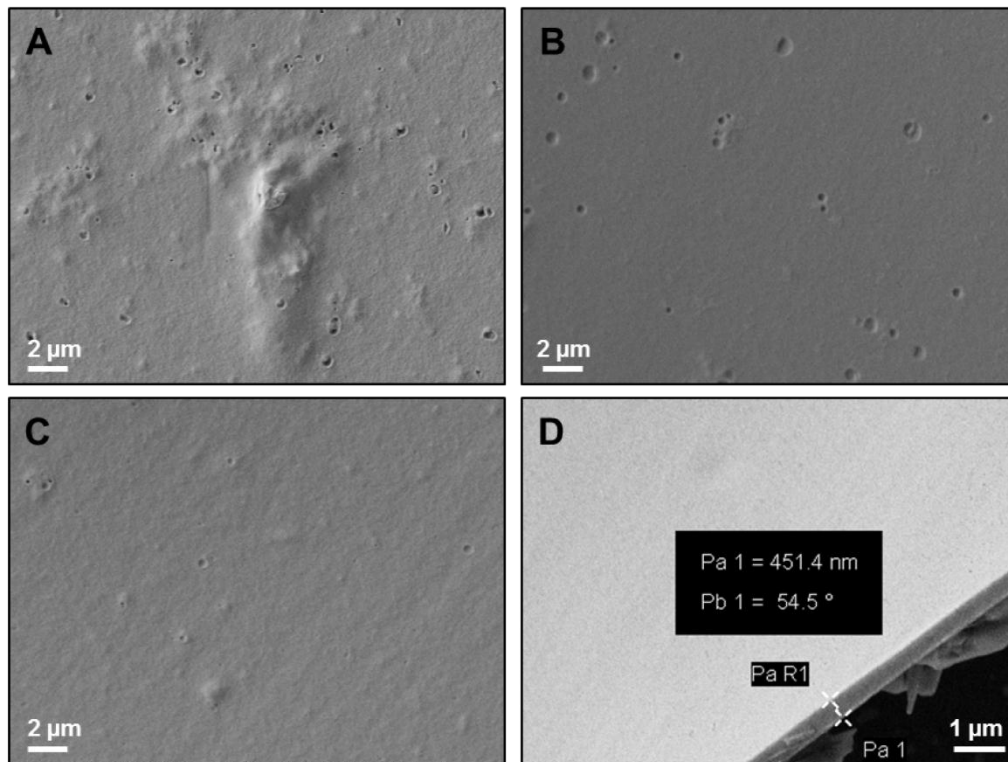


Abb. 10.3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von aus Ameisensäure gegossenen eADF4(C16)-Filmen (A) ohne Nachbehandlung bzw. nach Behandlung mit 70 % Methanol (B) bzw. 1 M Kaliumphosphat-Lösung (C) und (D). In (D) ist zudem die Messung der Dicke des Films gezeigt.

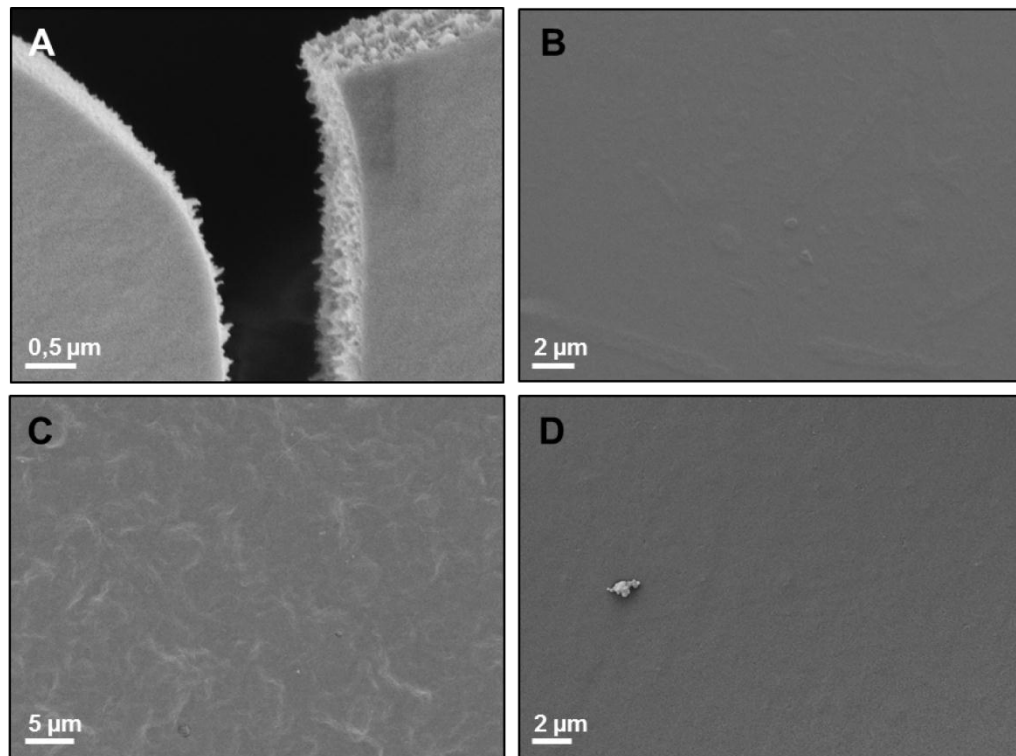


Abb. 10.4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von aus wässriger Lösung (5 mM NH_4HCO_3) gegossenen eADF4(C16)-Filmen. (A-C): ohne Nachbehandlung, (D) nachbehandelt mit Methanol abs. Film (A) wurde aus einer Lösung mit 0,3 mg/ml Protein gegossen, Filme (B-D) aus Lösung mit 2,0 mg/ml Protein. Für alle Filme wurde dieselbe Menge (50 μg) Protein eingesetzt.

10.3 Massenspektren

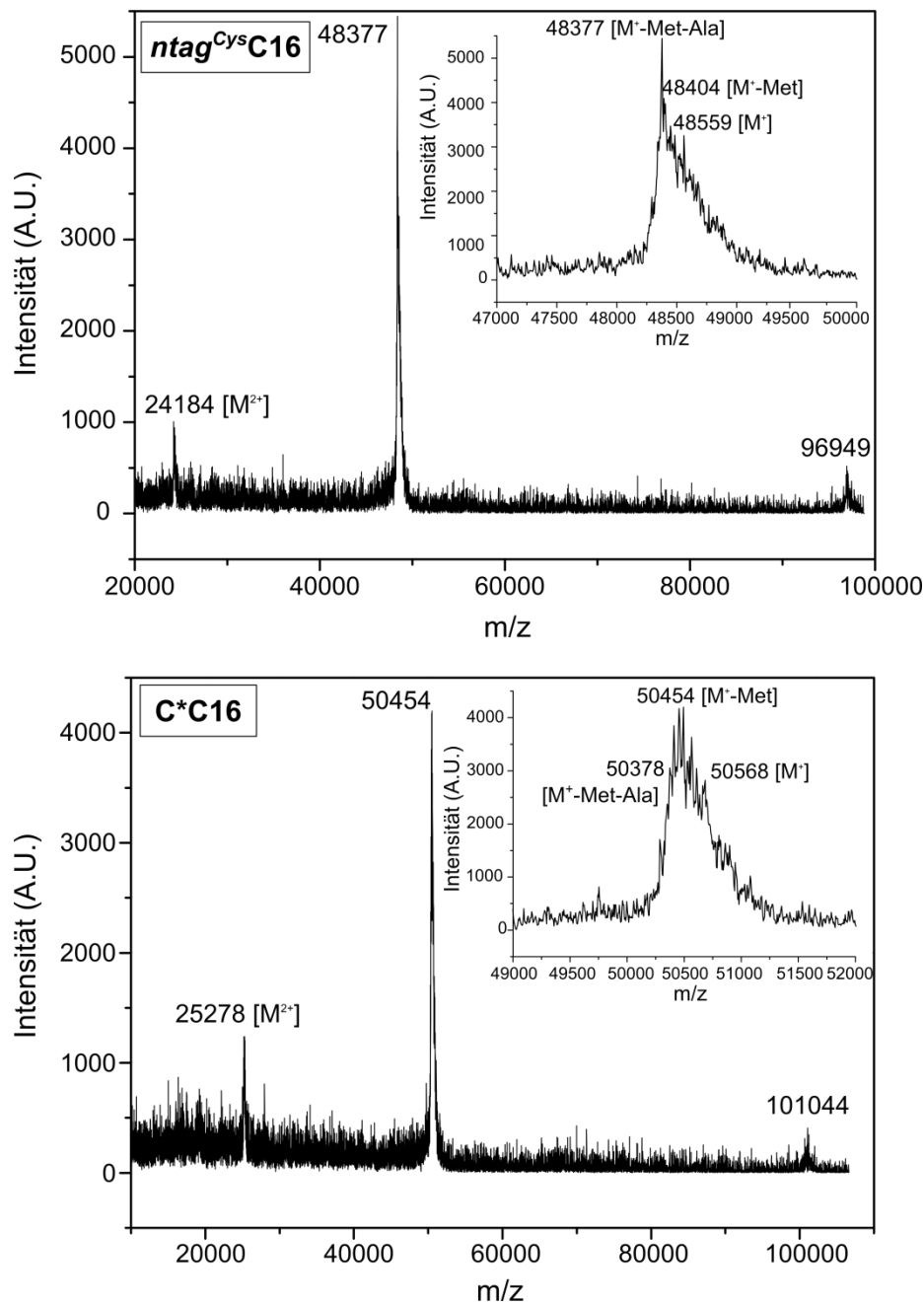


Abb. 10.5: Maldi-TOF Spektren der Proteine *ntag^{Cys}C16* (theoretische Molmasse 48546 g/mol) und *C^{*}C16* (theoretische Molmasse 50596 g/mol). [M⁺] entspricht dem ungekoppelten Protein; -Met (-Ala)=ohne Methionin (ohne Alanin).

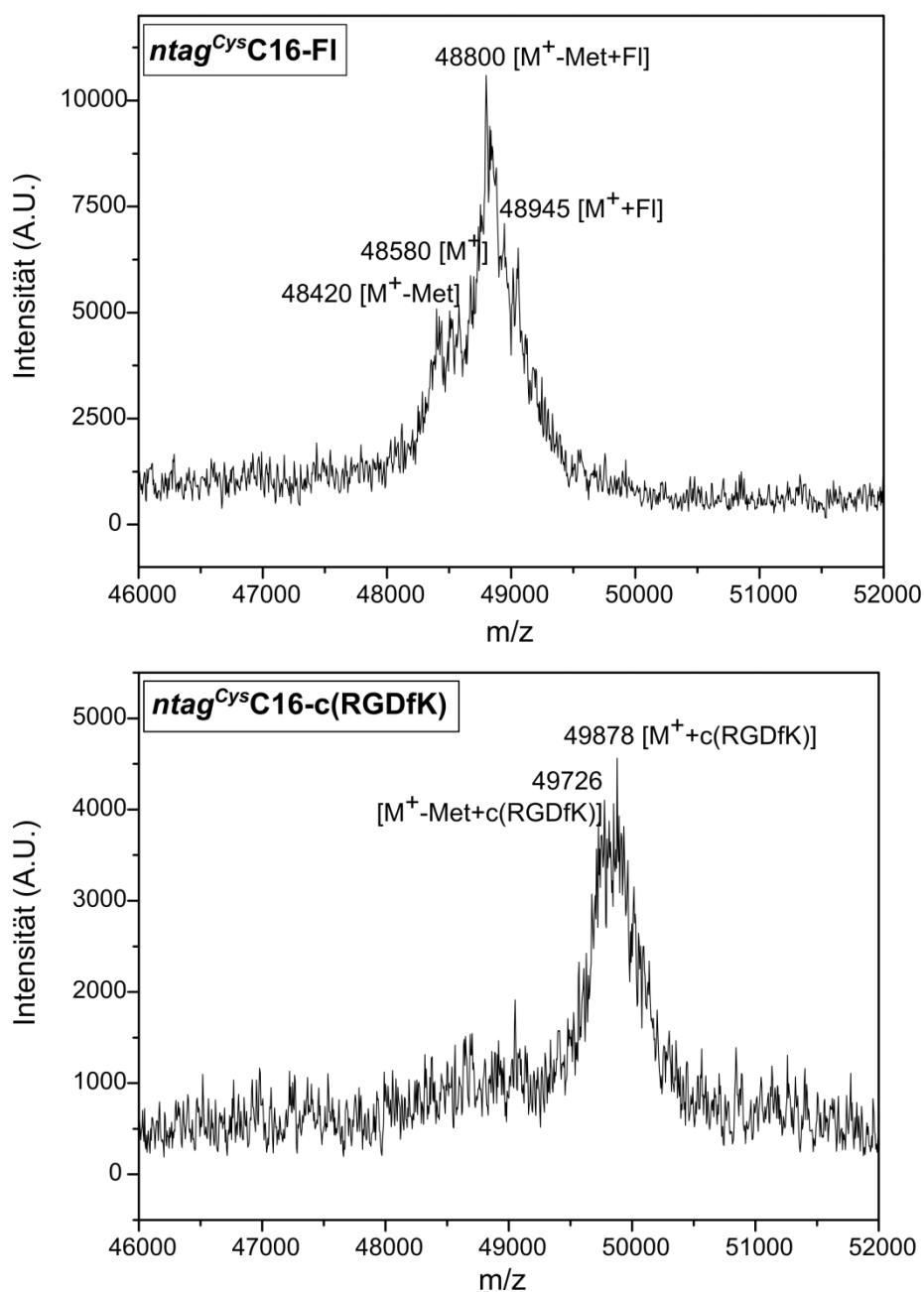


Abb. 10.6: Maldi-TOF Spektren. *ntag^{Cys}C16-FI*: *ntag^{Cys}C16* funktionalisiert mit Fluorescein, *ntag^{Cys}C16-c(RGDfK)*: *ntag^{Cys}C16* funktionalisiert mit c(RGDfK). $[M^+]$ entspricht dem ungekoppelten Protein; -Met=ohne Methionin. Die Molekulargewichte betragen 48546 g/mol (*ntag^{Cys}C16*), 427 g/mol (Fluorescein-Maleimid) und 1308 g/mol (c(RGDfK)).

10.4 Vektorkarten

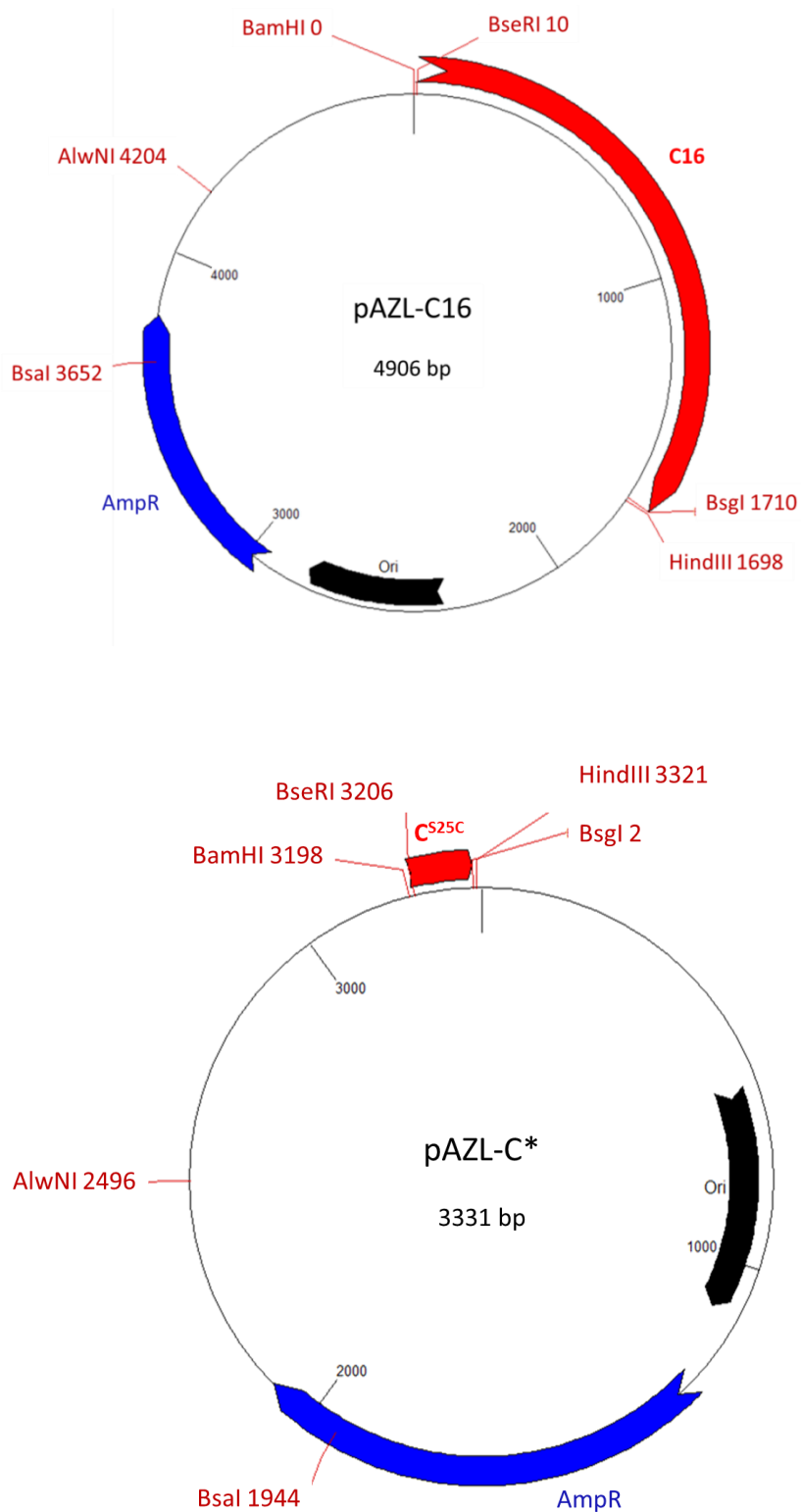


Abb. 10.7: Vektorkarten des Klonierungsvektors pAZL. Exemplarisch sind pAZL-C16 und pAZL-C* gezeigt. AmpR: Ampicillinresistenz-Gen

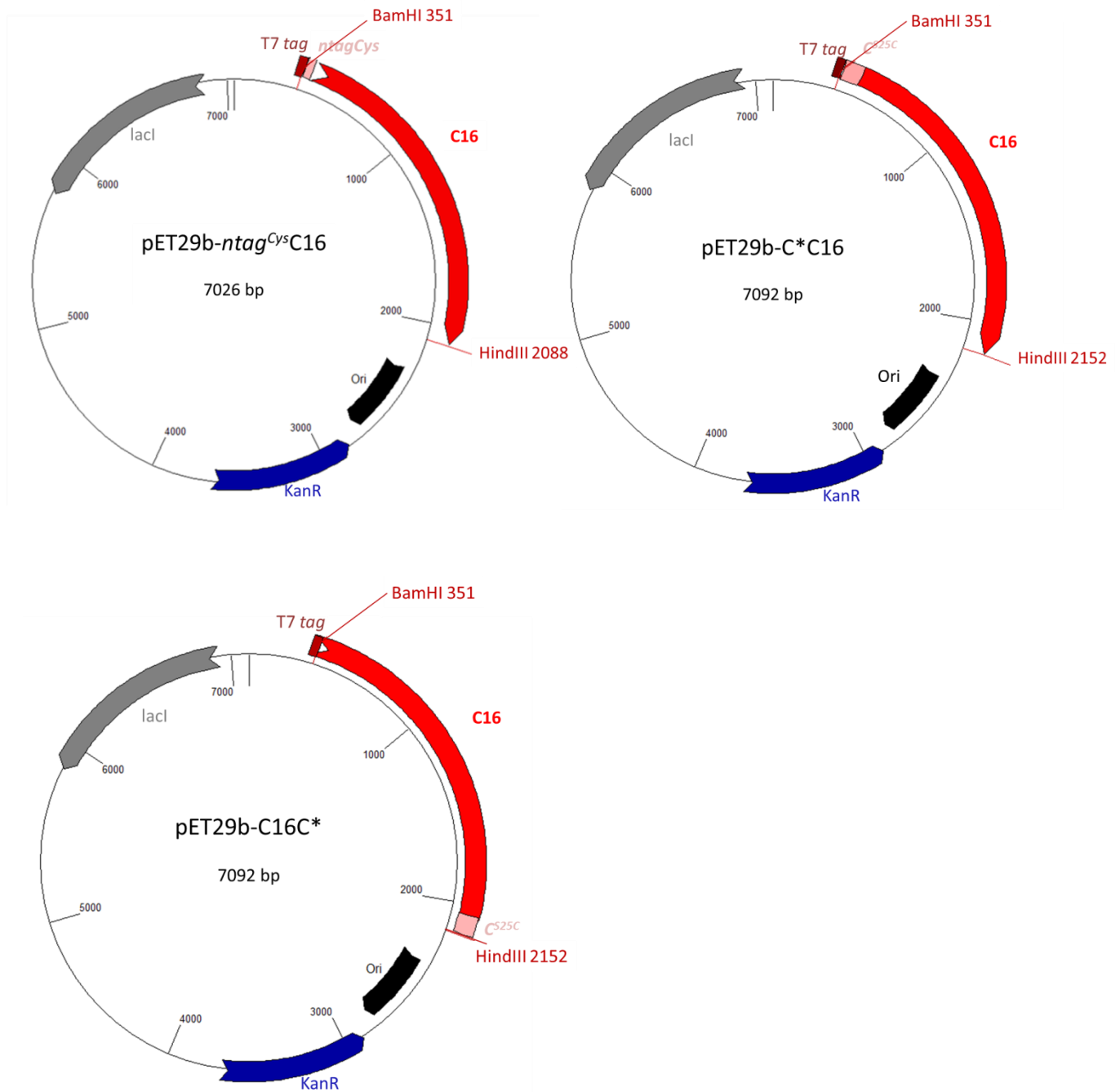


Abb. 10.8: Vektorkarten der jeweiligen Konstrukte im Expressionsvektor pET29b. KanR: Kanamycinresistenz-Gen

10.5 Proteinsequenzen

eADF4(C16):

MASMTGGQQMGRGSM GSSAA AAAAAASGPG GYGPENQGPS GPGGYGPGGP
GSSAA AAAAAASGPG GYGPENQGPS GPGGYGPGGP
GSSAA AAAAAASGPG GYGPENQGPS GPGGYGPGGP
GSSAA AAAAAASGPG GYGPENQGPS GPGGYGPGGP
GSSAA AAAAAASGPG GYGPENQGPS GPGGYGPGGP
GSSAA AAAAAASGPG GYGPENQGPS GPGGYGPGGP
GSSAA AAAAAASGPG GYGPENQGPS GPGGYGPGGP
GSSAA AAAAAASGPG GYGPENQGPS GPGGYGPGGP
GSSAA AAAAAASGPG GYGPENQGPS GPGGYGPGGP
GSSAA AAAAAASGPG GYGPENQGPS GPGGYGPGGP
GSSAA AAAAAASGPG GYGPENQGPS GPGGYGPGGP
GSSAA AAAAAASGPG GYGPENQGPS GPGGYGPGGP
GSSAA AAAAAASGPG GYGPENQGPS GPGGYGPGGP
GSSAA AAAAAASGPG GYGPENQGPS GPGGYGPGGP
GSSAA AAAAAASGPG GYGPENQGPS GPGGYGPGGP
GSSAA AAAAAASGPG GYGPENQGPS GPGGYGPGGP

ntag^{Cys}C16:

MASMTGGQQMGRGSM **CGCGSGGGGSGGGG** (GSSAA AAAAAASGPG GYGPENQGPS
GPGGYGPGGP)₁₆ G

C16C*:

MASMTGGQQMGRGSM (GSSAA AAAAAASGPG GYGPENQGPS GPGGYGPGGP)₁₆
GSSAA AAAAAASGPG GYGPENQGP**C** GPGGYGPGGPG

C*C16:

MASMTGGQQMGRGSM GSSAA AAAAAASGPG GYGPENQGP**C** GPGGYGPGGP
(GSSAA AAAAAASGPG GYGPENQGPS GPGGYGPGGP)₁₆ G

T7-tag, **ntag^{Cys}**, Mutation **S25C**

10.6 Hydropathizitätsplot

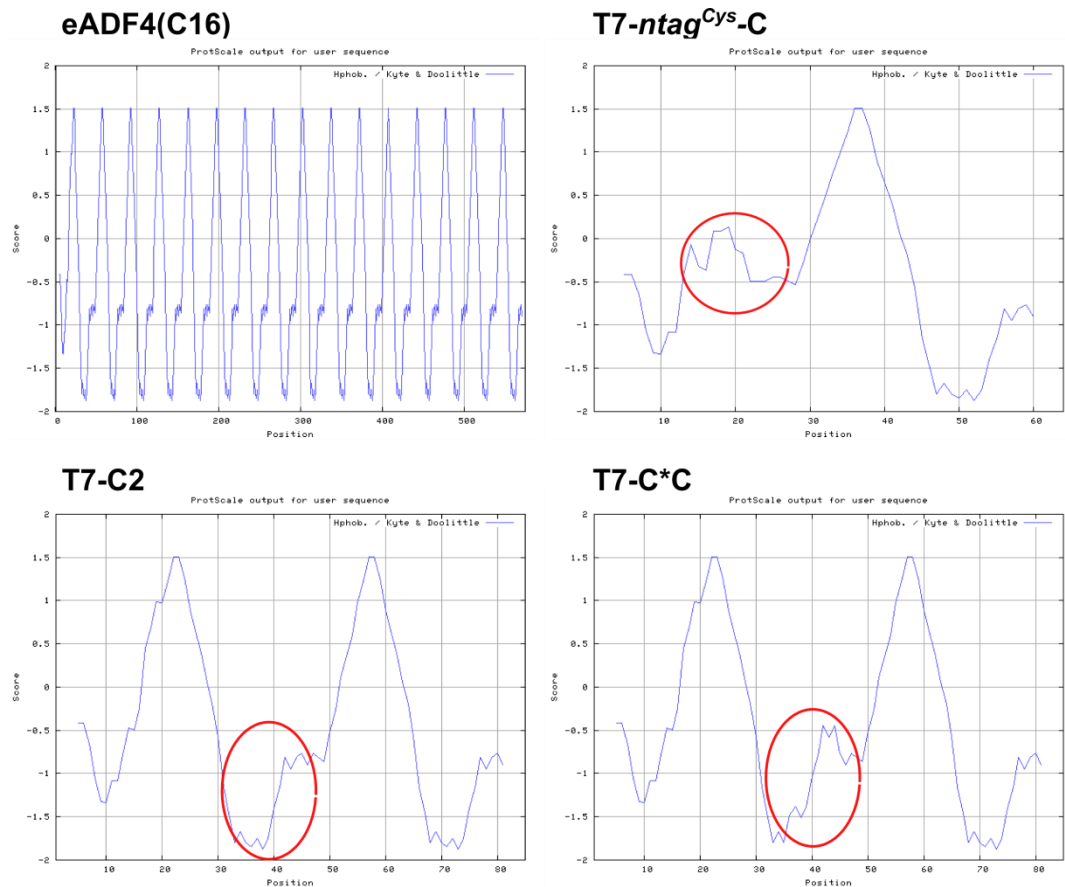


Abb. 10.9: Hydropathizitätsplots nach Kyte und Doolittle, 1982. (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>). Gezeigt sind die Plots für **eADF4(C16)** sowie der Aminotermi der jeweiligen Proteine (jeweils in Klammern angegeben):

- **T7-ntag^{Cys}C** (*ntag^{Cys}C16*): incl. T7-tag, *ntag^{Cys}* (roter Kreis) sowie das erste C-Modul
- **T7-C2** (**eADF4(C16)**): T7-tag sowie 2 C-Module
- **T7-C*C** (**C*C16**): T7-tag, das mutierte C*Modul (S25C) sowie ein weiteres C-Modul

Durch rote Kreise hervorgehoben ist der Bereich innerhalb des C-Moduls, welcher durch den Ser->Cys Austausch im Modul C* verändert ist.

Danksagung

Diese Arbeit wurde von Oktober 2005 bis Dezember 2007 am Lehrstuhl für Biotechnologie der TU München unter der Anleitung von Dr. Thomas Scheibel begonnen und anschließend bis Mai 2011 am neuen Lehrstuhl für Biomaterialien der Universität Bayreuth unter Prof. Dr. Thomas Scheibel fortgeführt. Ihm gilt mein besonderer Dank für die Möglichkeit, an diesem interessanten und vielseitigen Thema zu arbeiten sowie dafür, mir neue Perspektiven aufzuzeigen, wenn die Dinge mal ganz anders liefen. Durch die vielfältigen Aufgaben konnte ich eine Menge lernen. Ganz herzlich möchte ich mich auch für seine Unterstützung bedanken, Berufseinstieg und Promotion unter einen Hut zu bekommen.

Prof. Dr. Johannes Buchner danke ich für die Aufnahme an seinem Lehrstuhl während meiner Zeit an der TU München. Herzlicher Dank geht zudem an Prof. Dr. Franz X. Schmid für seine Bereitschaft, als Gutachter zur Verfügung zu stehen und damit meine Promotion an der Fakultät NW I zu ermöglichen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Claudia Blüm, Hendrik Bargel und Andreas Schmidt für zahlreiche REM-Analysen, Rainer Detsch für seine Ratschläge hierzu und Bettina Richter für die Anfertigung von REM- und TEM-Aufnahmen an der TU München
- Ute Kuhn für die Durchführung von DSC- und TGA Messungen
- Reiner Giesa für Anleitung und Hilfe bei den Zugmessungen
- Dominik Erhard für die Durchführung der Karl-Fischer-Titration
- Martin Humenik und Anja Goldmann für Durchführung von Maldi-Tof-Analysen.
- Prof. Dr. Horst Keßler und Dr. Monica Lopez für die Synthese und Bereitstellung des zyklischen RGD-Peptids c(RGDfK)
- Roxana Ene vom Lehrstuhl für Experimentelle Physik der Universität Leipzig (Prof. Dr. Friedrich Kremer) für die freundliche Aufnahme am Institut, anregende Diskussionen, ihre Expertise und Kooperation bzw. Durchführung von polarisierten FTIR-Messungen.
- Prof. Dr. Jürgen Senker und Dr. Caroline Keenan für die ssNMR-Messungen der Seidenfilme.
- Markus, Michi und Lukas für das Korrekturlesen und wertvolle Kommentare zu dieser Arbeit
- Steffi für konstruktive, kompetente und sehr angenehme Zusammenarbeit und ihren Einsatz während ihrer Hiwizeit, Diplomarbeit und Beginn ihrer Doktorarbeit

Meinen Kollegen des Lehrstuhls danke ich für die angenehme Atmosphäre, für Tips und Tricks im Laborleben, viele lustige Momente und natürlich den Altfibers für das legendäre Fiber-Feeling.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Bürokollegen Anja, Ute und Markus für die freundschaftliche Bürogemeinschaft, persönliche und fachliche Bereicherung und unzählige „Whoozas“. Claudia, Steffi und Andrew danke ich für ihr allzeit offenes Ohr und Hilfe jedweder Art, besonders bei meinen Gastbesuchen am Lehrstuhl. „Tschüssla“ John Hardy danke ich zudem für viele hilfreiche Diskussionen sowie seine unvergleichliche Art.

Ganz besonders bedanke ich mich bei allen, die mein Leben begleitet und bereichert haben: meinen Eltern und meiner Schwester, die mich immer bedingungslos unterstützen und mir den Rücken stärken, meinen Freunden sowie allem, was man in Franken so findet. Das is scho furchtbar hier!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth, den 10.April 2012